



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİŞ BEYAZLATICI VE ANTİOKSİDAN AJANLARIN
ETKİLERİNİN DENTAL PULP STEM CELL (DPSC)
HÜCRE DİZİSİNDE İNCELENMESİ**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

Mukaddes MERGEN DALYANOĞLU

**Haziran 2016
DENİZLİ**

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİŞ BEYAZLATICI VE ANTİOKSİDAN AJANLARIN ETKİLERİNİN
DENTAL PULP STEM CELL (DPSC) HÜCRE DİZİSİNDE
İNCELENMESİ**

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Mukaddes MERGEN DALYANOĞLU

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sebahat TURGUT

Denizli 2016

DOKTORA TEZİ ONAY FORMU

Mukaddes Mergen DALYANOĞLU tarafından Prof. Dr. Sebahat TURGUT yönetiminde hazırlanan "Diş Beyazlatıcı ve Antioksidan Ajanların Etkilerinin Dental Pulp Stem Cell (DPSC) Hücre Dizinde İncelenmesi" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş olup, kapsamı ve niteliği açısından bir doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Osman GENÇ
Dumlupınar Üniversitesi

Üye(DANIŞMAN) Prof. Dr. Sebahat TURGUT
Pamukkale Üniversitesi

Üye: Pror. Dr. Vural KÜÇÜKATAY
Pamukkale Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. İsmail KARABULUT
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Yavuz DODURGA
Pamukkale Üniversitesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 17.10.2016
Tarih ve ...13...2...sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zekiye Melek BOR KÜÇÜKATAY

Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Mukaddes MERGEN DALYANOĞLU

İmza :

ÖZET

DIŞ BEYAZLATICI VE ANTİOKSİDAN AJANLARIN ETKİLERİNİN DENTAL PULP STEM CELL (DPSC) HÜCRE DİZİSİNDE İNCELENMESİ

Mergen Dalyanoğlu, Mukaddes
Doktora Tezi, Fizyoloji AD
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Sebahat TURGUT

Haziran 2016, 109 Sayfa

Beyaz bir gülüş modern toplumumuzda arzulanan estetik durumdur ve diş beyazlatıcı ajanlarla sağlanmaktadır. Diş beyazlatıcılar peroksit içermekte ve hücrel hasar oluşturabildikleri öne sürülmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, diş pulpası kök hücresi (DPSC) kültürlerine hidrojen peroksit uygulanmasının etkilerini ve E vitamininin ve *crithmum maritimumun* oluşabilecek hasara karşı koruyucu etkilerinin olup olmadığını araştırmak amaçlanmıştır. Bu amaçla kontrol (K), 2 Hidrojen Peroksit (2HP) (2 µg/ml), 6 Hidrojen Peroksit (6HP) (6 µg/ml), E vitamini (100 µM)+2 Hidrojen Peroksit (E2HP), E vitamini (100 µM)+6 Hidrojen Peroksit (E6HP), Crithmum Maritimum (2 µg/ml)+2 Hidrojen Peroksit (CM2HP) ve Crithmum Maritimum (2 µg/ml)+6 Hidrojen Peroksit (CM6HP) olmak üzere 7 çalışma grubu oluşturuldu. DPSC kültür ortamında çoğaltılıp gruplara uygun muameleler yapıp hücreler 0, 24, 48, 72 saat sonra ortamlardan uzaklaştırılarak DNA hasarı, TNF α, IL-6, TOS ve TAS seviyeleri ölçüldü. DNA hasarı comet analiz yöntemi ile TNF α, IL-6, TOS ve TAS seviyeleri uygun ticari kitler kullanılarak ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. Comet parametrelerinden kuyruk uzunluğu, sadece HP uygulanan gruplarda, 48 saat sonra ölçümü yapılan 6HP grubu hariç diğer tüm zamanlardaki ölçümlerde kontrole göre artış gözlenmiştir. E vitamini ve CM uygulanan grupların 0, 24, 72 saat sonra ölçülen kuyruk uzunluğu ortalamaları, sadece HP uygulanan gruplara göre anlamlı olarak azalmıştır. Kuyruk yoğunluğu ortalamaları, 2HP ve 6HP gruplarında kontrole göre anlamlı olarak artmakla beraber; E vitamini ve CM uygulanan gruplarda 6HP grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Kuyruk momenti ortalamaları 2HP ve 6HP gruplarında tüm zamanlar kontrole göre anlamlı olarak artmıştır. 0, 48 ve 72 saat sonra yapılan ölçümlerde E vitamini ve CM gruplarının ortalamaları, 6HP grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. 24 saat sonra yapılan ölçümlerde E vitamini ve CM gruplarının ortalamalarının, 2 HP grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Grupların TNF α, IL-6, TAS ve TOS düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Sonuç olarak bulgularımız HP'nin genotoksisiteye yol açtığını, E vitamini ve CM'un HP kaynaklı DNA hasarını azalttığını göstermektedir. Aynı zamanda sonuçlarımıza göre genotoksisitenin oksidatif stres kaynaklı olmadığını söyleyebiliriz. Genotoksisitenin hangi mekanizmalarla olduğunun aydınlatılması için daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar Kelimeler: Beyazlatma, Dental Pulp Stem Cell, E vitamini, Crithmum Maritimum, Comet Assay

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2014SBE005).

ABSTRACT**THE RESEARCH OF THE EFFECTS OF DENTAL BLEACHING AND ANTIOXIDANT AGENTS ON DENTAL PULP STEM CELL (DPSC) LINEAGE**

Mergen Dalyanoğlu, Mukaddes
PhD Thesis in Physiology
Supervisor: Prof. Dr. Sebahat TURGUT (DVM, PhD)

June 2016, 109 Pages

A white smile is a desired aesthetic feature in our modern society, which is provided with tooth bleaching agents. Tooth bleaching agents contain peroxide and are asserted to cause potential cellular damage. Therefore, our study aims to find the effects of application of hydrogen peroxide on dental pulp stem cell (DPSC) cultures and whether vitamin E and *crithmum maritimum* have any protective effects against the potential damage to occur. To this end, 7 study groups were created, namely the control (C) group, 2 Hydrogen Peroxide (2HP) (2 µg/ml), 6 Hydrogen Peroxide (6HP) (6 µg/ml), vitamin E (100 µM)+2 Hydrogen Peroxide (E2HP), vitamin E (100 µM)+6 Hydrogen Peroxide (E6HP), *Crithmum Maritimum* (2 µg/ml)+2 Hydrogen Peroxide (CM2HP) and *Crithmum Maritimum* (2 µg/ml)+6 Hydrogen Peroxide (CM6HP) groups. Reproduced DPSC in culture media and treated according to the assigned groups, the cells were removed from their media at 0, 24, 48, 72 hours, and DNA damage and TNF α, IL-6, TOS and TAS levels were measured. DNA damage was measured using comet assay method and TNF α, IL-6, TOS and TAS levels were measured with ELISA method using commercially-available kits. Tail length, one of the comet parameters, was observed to increase in groups treated with only HP, compared to the control group, in measurements at all time points, except the 6HP group that was measured at 48 hours. Average tail lengths of groups treated with vitamin E and CM measured at 0, 24 and 72 hours reduced significantly compared to the HP-treated groups. While average tail intensities of 2HP and 6HP groups increased significantly compared to the control group, a significant decrease was found in groups treated with vitamin E and CM in comparison to the 6HP group. Average tail moments increased significantly in 2HP and 6HP groups at all time points compared to the control group. Measurements performed at 0, 48 and 72 hours showed a significant decrease in averages of vitamin E and CM groups compared to the 6HP group. Measurements performed at 24 hours showed a significant decrease in averages of vitamin E and CM groups compared to the 2HP group. A comparison of TNF α, IL-6, TAS and TOS levels of the study groups did not reveal a significant difference. As a result, our findings demonstrate that HP leads to genotoxicity, and that vitamin E and CM decreases HP-induced DNA damage. Furthermore, we can conclude from our results that the genotoxicity was not caused by oxidative stress. Further studies are needed to explain the mechanisms involved in genotoxicity.

Key Words: Bleaching, Dental Pulp Stem Cell (DPSC), vitamin E, *Crithmum Maritimum*, Comet Assay

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: 2014SBE005).

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam süresince kullandığım materyallerin temin edilmesinde ve analizlerinde her türlü desteği sağlayan, tecrübelerinden yararlandığım başta tez danışman hocam Prof. Dr. Sebahat TURGUT'a,

Tez çalışmam sürecinde yardımlarını esirgemeyen ve kritik yorumlarını paylaştan, eğitimim boyunca bana sonsuz emekleri geçen hocalarım Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Günfer TURGUT'a, Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY'a, Prof. Dr. Melek BOR-KÜÇÜKATAY'a, Prof. Dr. Saadettin ÇALIŞKAN'a ve Doç. Dr. Yavuz DODURGA'ya,

Tez çalışmam boyunca yanımda olan asistan arkadaşlarıma, Diş Hekimliği fakültesindeki mesai arkadaşlarıma ve tüm hayatım boyunca her koşulda yanımda olan canım aileme ve dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Saygılarımla

Haziran - 2016

Mukaddes MERGEN DALYANOĞLU

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç	2
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMALARI	3
2.1. Diş Beyazlatma	3
2.1.1. Diş Beyazlatmanın Tarihçesi	4
2.1.2. Diş Beyazlatıcıların İçeriği	4
2.1.2.1 Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	4
2.1.2.2 Karbamid Peroksit (CH ₆ N ₂ O ₃)	5
2.1.2.3 Sodyum Perborat (NaBO ₃)	5
2.1.2.4 Klor Dioksit (ClO ₂)	5
2.1.3. Diş Beyazlatıcıların Etki Mekanizması	6
2.1.3.1 Difüzyon	6
2.1.3.2 Etkileşim	6
2.1.3.3 Yüzey Değişimi	8
2.1.4. Diş Beyazlatıcıların Diş Üzerine Etkileri	8
2.1.4.1 Mine ve Dentin Yüzeyine Etkileri	8
2.1.4.2 Mine ve Dentin Mikrosertliği Üzerine Etkileri	9
2.1.4.3 Mine ve Dentin Ultrastruktürüne Etkileri	10
2.1.4.4 Pulpa Üzerine etkileri	10
2.1.5. Diş Beyazlatıcıların Yumuşak Dokular Üzerine Etkileri	11
2.1.6. Diş Beyazlatıcılar ve Diş Hassasiyeti	11
2.1.7. Diş Beyazlatıcıların Toksisitesi	12
2.1.8. Diş Beyazlatmayı Etkileyen Faktörler	13
2.1.9. Diş Beyazlatmanın Yan Etkileri	13
2.2. Kök Hücre	13
2.2.1. İnsan Diş Kök Hücresi	14

2.3.	Sitokinler	16
2.3.1.	Diş Dokusunda Üretilen Sitokinler	17
2.4.	E Vitamini	18
2.4.1.	Serbest Radikaller	19
2.4.2.	Oksidatif Hasar	19
2.5.	<i>Crithmum maritimum</i> L.	20
2.6.	Hipotezler	20
3.	GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	21
3.1.	Deney Grupları	21
3.2.	DPSC Hücrelerinin Kültüre Edilmesi	22
3.2.1.	DPSC Hücrelerinin Dondurulması	23
3.2.2.	Dondurulmuş DPSC Hücrelerinin Çözdürülmesi	23
3.2.3.	DPSC Hücrelerinin Pasajlanması	24
3.2.4.	DPSC Canlı Hücrelerinin Sayılması	24
3.3.	Sitotoksosite Analizi	25
3.3.1.	XTT Testi	25
3.3.2.	Hidrojen peroksit, E vitamini ve CM uçucu yağının sitotoksitesinin belirlenmesi	26
3.3.3.	XTT Yöntemi	26
3.3.4.	XTT İçin Deney Düzenine Kurulması ve Hidrojen Peroksit, E vitamini ve <i>Crithmum Maritimum</i> Uçucu Yağının Uygulanması	27
3.4.	<i>Crithmum Maritimum</i> Uçucu Yağının Eldesi	28
3.5.	TAS, TOS, TNF Alfa ve IL-6 İçin Deney Düzenine Kurulması ve Hidrojen Peroksit, E vitamini ve <i>Crithmum Maritimum</i> Uçucu Yağının Uygulanması	28
3.6.	Total Oksidan Seviye (TOS) Ölçümü	29
3.7.	Total Antioksidan Seviye (TAS) Ölçümü	30
3.8.	Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)	31
3.9.	Komet Yöntemi ile Genotoksosite Analizi	31
3.9.1.	Komet Analizi ve Tarihçesi	32
3.9.2.	Kometin Analizinde Boyama	32
3.9.3.	Görüntü Analizi	33
3.9.4.	Komet Analizinde Preparat Değerlendirilmesi	34
3.9.5.	Komet Analizi (Tek Hücre Jel Elektrofrezisi)	34
3.9.6.	Komet Analizi Yöntemi	34
3.10.	İstatistiksel Analiz	36

4. BULGULAR.....	37
4.1. Genotoksisitenin Belirlenmesi	37
4.1.1. Baş Uzunluğunun Belirlenmesi	37
4.1.2. Kuyruk Uzunluğunun Belirlenmesi	39
4.1.3. Baş Yoğunluğunun Belirlenmesi	41
4.1.4. Kuyruk Yoğunluğunun Belirlenmesi	43
4.1.5. Kuyruk Momentinin Belirlenmesi	45
4.1.6. Kuyruk Migrasyonunun Belirlenmesi	48
4.2. TNF α Seviyesinin Belirlenmesi	54
4.3. IL-6 Seviyesinin Belirlenmesi	54
4.4. TOS Değerlendirilmesi	55
4.5. TAS Değerlendirilmesi	56
4.6. OSİ Değerlendirilmesi	56
4.7. XTT Değerlendirilmesi	57
5. TARTIŞMA.....	63
6. SONUÇLAR.....	76
7. KAYNAKLAR.....	79
8. ÖZGEÇMİŞ.....	96

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Dişten elde edilen kök hücreler	16
Şekil 2.2 TNF ve IL-6'nın etkileri	17
Şekil 2.3 Alfa tokoferolün yapısı	18
Şekil 3.1 DPSC'nin mikroskopik görüntüsü	22
Şekil 3.2 DPSC'nin 21 gün sonraki pasajlanma öncesi mikroskopik görüntüsü	24
Şekil 4.1 Gruplar arasında baş uzunluğunun değerlendirilmesi	38
Şekil 4.2 Kontrol grubunun tüm parametrelerinin grup içi değerlendirilmesi	39
Şekil 4.3 Gruplar arasında kuyruk uzunluğunun değerlendirilmesi	40
Şekil 4.4 2HP grubunun tüm parametrelerinin grup içi değerlendirilmesi	41
Şekil 4.5 Gruplar arasında baş yoğunluğunun değerlendirilmesi	42
Şekil 4.6 6HP grubunun tüm parametrelerinin grup içi değerlendirilmesi	43
Şekil 4.7 Gruplar arasında kuyruk yoğunluğunun değerlendirilmesi	44
Şekil 4.8 E2HP grubunun tüm parametrelerinin grup içi değerlendirilmesi	45
Şekil 4.9 Gruplar arasında kuyruk momentinin değerlendirilmesi	46
Şekil 4.10 E6HP grubunun tüm parametrelerinin grup içi değerlendirilmesi	47
Şekil 4.11 CM2HP grubunun tüm parametrelerinin grup içi değerlendirilmesi	47
Şekil 4.12 Gruplar arasında kuyruk migrasyonunun değerlendirilmesi	48
Şekil 4.13 CM6HP grubunun tüm parametrelerinin grup içi değerlendirilmesi	49
Şekil 4.14 Çalışmamızdaki hasarsız komet görüntüsü (solda), hasarlı komet görüntüsü (sağda)	49
Şekil 4.15 Gruplar arasında TNF Alfa seviyelerinin değerlendirilmesi	54
Şekil 4.16 Gruplar arasında IL-6 seviyelerinin değerlendirilmesi	55
Şekil 4.17 Gruplar arasında TOS değerlendirilmesi	55
Şekil 4.18 Gruplar arasında TAS değerlendirilmesi	56
Şekil 4.19 Gruplar arasında OSİ değerlendirilmesi	57
Şekil 4.20 Hidrojen peroksitin XTT sonuçlarının değerlendirilmesi	57
Şekil 4.21 E vitamininin XTT sonuçlarının değerlendirilmesi	58
Şekil 4.22 Crithmum maritimumun XTT sonuçlarının değerlendirilmesi	58

TABLULAR DİZİNİ

		Sayfa
Tablo 2.1	Diş beyazlatıcı ajanların özellikleri	5
Tablo 4.1	Tüm grupların sıfırncı saatteki komet parametrelerinin karşılaştırılması, ort±S.S	50
Tablo 4.2	Tüm grupların yirmi dördüncü saatteki komet parametrelerinin karşılaştırılması, ort±S.S	51
Tablo 4.3	Tüm grupların kırk sekizinci saatteki komet parametrelerinin karşılaştırılması, ort±S.S	52
Tablo 4.4	Tüm grupların yetmiş ikinci saatteki komet parametrelerinin karşılaştırılması, ort±S.S	53
Tablo 4.5	Gruplar arası sıfırncı saatteki TNF- α , IL-6, TOS, TAS ve OSİ seviyelerinin karşılaştırılması, ort±S.S.	59
Tablo 4.6	Gruplar arası yirmi dördüncü saatteki TNF- α , IL-6, TOS, TAS ve OSİ seviyelerinin karşılaştırılması, ort±S.S.	60
Tablo 4.7	Gruplar arası kırk sekizinci saatteki TNF- α , IL-6, TOS, TAS ve OSİ seviyelerinin karşılaştırılması, ort±S.S.	61
Tablo 4.8	Gruplar arası yetmiş ikinci saatteki TNF- α , IL-6, TOS, TAS ve OSİ seviyelerinin karşılaştırılması, ort±S.S.	62

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskopisi
BU	Baş Uzunluğu
BY	Baş Yoğunluğu
Ca ⁺⁺	Kalsiyum iyonu
CM	<i>Crithmum Maritimum</i>
CP	Karbamid Peroksit
CSF	Koloni Stimulan Faktör
DNA.....	Deoksiribonükleik asit
DPSC	Dental Pulp Stem Cell
Fe.....	Demir
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
GM-CSF	Granülosit Makrofaj Koloni Stimulan Faktör
HCl.....	Hidroklorik asit
HDPC	Human Dental Pulp Cell
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HO	Hem Oksijenaz
HP	Hidrojen peroksit
HRP-SA.....	Horseradish peroksidaz konjugatı streptavidin
HP	Hidrojen Peroksit
IU/ml.....	İnternasyonal ünite/mililitre
IL.....	İnterlökin
KMi	Kuyruk Migrasyonu
KMo	Kuyruk Momenti
KU	Kuyruk Uzunluğu
KY	Kuyruk Yoğunluğu
LPS	Lipopolisakkarit
M-CSF	Makrofaj Koloni Stimulan Faktör
MDPC-23	Mouse Dental Papil Cell-23
μ m	Mikrometre
mRNA.....	Haberci ribonükleikasit
MTT	Metil Tetrazolyum
Na ⁺	Sodyum iyonu
O ₂ ^{•-}	Süperoksit radikali anyonu
O ₂	Moleküler oksijen
OONO ⁻	Peroksinitrit anyonu
OSİ	Oksidatif Stres İndeksi
PBS.....	Fosfat tamponu
PGE ₂	Prostaglandin-E ₂
RIPA.....	Radioimmunopresipitasyon
RNA.....	Ribonükleik asit
ROT.....	Reaktif oksijen türleri
Rpm.....	Dakikadaki devir sayısı
TAS	Toplam Antioksidan Seviye
TNF- α	Tümör nekroz faktörü- α
TOS	Toplam Oksidan Seviye
TRPA1	Transient receptor potential cation channel A1
UVA	Ultraviyole
XTT	(2,3-Bis-(2-Metoksi-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazolyum-5-Karboksanilit tuzu)



1. GİRİŞ

Beyaz bir gülüş modern toplumumuzda arzulanan bir estetik durum olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu istek diş beyazlatıcı ajanlarla karşılanmaktadır. Ancak bu ajanların yan etkileri, diş hassasiyeti ve gingivitis olarak klinikte karşımıza çıkmakta ve hastanın yaşam konforunu belli bir süre olumsuz olarak etkilemektedir (Costa vd 2010, Bruzell vd 2013).

Diş beyazlatıcı ajanlar peroksit içerikli oldukları için oksidatif stresten kaynaklanan sitotoksik yan etkileri yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. Bütün diş beyazlatıcı ajanların, vasküler permeabiliteyi arttırdığı bildirilmiştir (Gonçalves vd 1998). *Rhus verniciflua Stokes* bitkisinden elde edilen buteinin, hem oksijenaz-1'in (HO-1) protein ekspresyonunu ve hem oksijenaz (HO) aktivitesini arttırarak hidrojen peroksit (HP) bağlı dental hücre ölümüne karşı sitoprotektif etkilere sahip olduğu ve reaktif oksijen türleri (ROT) üretiminin inhibisyonunu sağladığı bildirilmiştir. Ayrıca nükleer faktör-E2-ilişkili faktör 2 (Nrf2)'nin akümülyasyonunu ve antioksidan yanıt elementlerinin (antioxidant response elements, AREs) promoter aktivitesini arttırarak pulpayı hasarlardan koruduğu bildirilmiştir (Lee vd 2013).

Fare dental papil hücrelerinde (MDPC-23) diş beyazlatıcıların (Mouse dental papil cell) hücre metabolizması üzerine etkisinin incelendiği çalışmada, diş beyazlatıcı uygulandıktan sonra, metiltetrazolium (MTT) analiziyle metabolik aktivite değerlendirildiğinde, %10 karbamid peroksit (CP) uygulamanın etkisinin anlamlı olmadığı, %16 CP'nin metabolizmayı azaltıcı etkisi olduğu bildirilmiştir. Böylece diş beyazlatıcı ajanların konsantrasyon artışı ile hücre metabolizmasının azaldığı gösterilmiştir (Soares vd 2011). Benzer şekilde %16 CP'in MDPC-23 hücrelerinin canlılığında belirgin azalmaya neden olduğu, %16 CP ile birlikte antioksidan olarak %10 sodyum askorbat (SA) uygulanmasının, CP'nin sitotoksik etkilerini bir parça engellediği bildirilmiştir (Lima vd 2010). Beyazlatılmış mineye, restorasyon işlemlerinden önce antioksidan olarak üzüm çekirdeği ekstresi uygulamanın, beyazlatmanın zararlı etkilerini nötralize ettiği ve restorasyonun bağlanma gücünü arttırdığı bildirilmiştir (Vidhya vd 2011).

Diş beyazlatıcı olarak kullanılan hidrojen peroksitin (HP) hem ışıklı hem de ışısız uygulaması yapılmaktadır. Her iki uygulamanın %35 HP kullanılarak yapıldığı

çalışmada ışıklı diş beyazlatmanın sadece kimyasal olarak beyazlatmaya göre odontoblastlara daha fazla sitotoksik etki oluşturduğu bildirilmiştir. Bu çalışma diş beyazlatıcı ajanın konsantrasyonu yanında ışıkla uygulanmasının sitotoksisite üzerindeki önemini göstermiştir (Coldebella vd 2009). Ayrıca son zamanlarda yapılan bir çalışmada hiçbir kimyasal ajan uygulamadan sadece ışık uygulamanın bile vasküler permeabiliteyi arttırdığı, apoptozu indüklediği, lipid peroksidasyona neden olduğu bildirilmiştir (Yoshino vd 2012).

Ev tipi beyazlatmada kullanılan plakların rezervuar hazırlanarak ve hazırlanmadan diş beyazlatıcı uygulanması sonucu rezervuarlı tarafta beyazlatmadan hemen sonra enflamasyon artışı bildirilmiştir. 30-45 gün sonra rezervuarlı tarafta ağır enflamasyon, rezervuarsız tarafta orta derecede enflamasyon varlığı bildirilmiştir. Enflamasyonun beyazlatma bitiminden 45 gün sonra kadar devam ettiği bildirilmiştir. Böylece diş beyazlatıcı ajanın miktarının da enflamasyonla doğru orantılı olduğu gösterilmiştir (Kirsten vd 2009). Ev tipi ve kimyasal olarak aktive olan ofis tipi beyazlatma sistemlerinde gingival enflamasyonun ve IL-1beta seviyelerinin ışıkla aktive olan ofis tipi beyazlatma sistemlerine göre daha az olduğu bildirilmiştir (Fırat vd 2011).

Diş beyazlatıcı ajanların diş pulpası kök hücrelerinde DNA hasarına yol açıp açmadığı eğer böyle bir hasar varsa antioksidanların bunu onarmada etkisinin olup olmadığı bilinmemektedir. Oysa bu soruların cevaplarının bilinmesi diş hekimleri için önem taşımakta olup yeni diş beyazlatma protokollerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilecektir. Bu nedenle çalışmamız literatürdeki bu boşluğu dolduracaktır. Antioksidanların oluşabilecek DNA hasarını azaltmada katkısı olup olmadığını açıklamış olacaktır. Olası olumlu etkiler sayesinde iyileşme süresi kısılacak, beyazlatma sonrası yaşam kalitesinin artmasına katkı sağlayacaktır.

1.1. Amaç

Çalışmamızda diş beyazlatıcı ajan olarak hidrojen peroksit uygulanmasının diş pulpası kök hücrelerinde (DPSC) DNA hasarı oluşturup oluşturmadığını ve ayrıca DNA hasarı oluşturuyorsa antioksidan olarak E vitamini ve *Crithmum maritimum* L. bitkisinin uçucu yağının bu hasarı düzeltmede etkili olup olmadığını Komet analiz yöntemiyle incelenmesi, diş beyazlatma sırasında uygulanan hidrojen peroksit nedeniyle DPSC'de enflamatuar yanıtın oluşup oluşmadığını ve enflamatuar yanıt varsa antioksidanların etkilerini TNF α ve IL-6 seviyelerinin ölçümü ile gözlemlemek, ayrıca hidrojen peroksit ve antioksidanlardan E vitamini ve *C. maritimum* bitkisinin uçucu yağının total oksidan seviye ve total antioksidan seviyeye etkisini gözlemlemek amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Diş Beyazlatma

Diş beyazlatma günümüzde estetik ve kozmetik diş hekimliğinin en popüler konusu haline gelmiştir. Beyazlatma tedavilerinin başlıca materyali hidrojen peroksittir. Hidrojen peroksit düşük molekül ağırlığına sahip olduğundan dokulara kolaylıkla diffüze olur, pek çok çözücüde özellikle de suda serbest radikallerine ayrışır. Renklenmiş dişlerin tedavilerinde temel işlem renklenmiş bölgelerin oksidasyonudur. Renk açma yeteneğinin esası bu ajanın, moleküllerin absorpsiyon enerjilerini değiştirmesidir (Kwon ve Wertz 2015).

Diş beyazlatmak için uygulanan jel teknikleri, günümüzde en popüler ve yaygın kullanıma sahip diş beyazlatma tekniklerdir. Düşük ve yüksek konsantrasyonda beyazlatıcı jellerin kullanıldığı bu tekniklerde kullanılan ürünler aktif madde olarak genellikle karbamid peroksit (KP) ya da hidrojen peroksit (HP) içermektedirler. Jel teknikleri kullanılan ürünlerin konsantrasyonuna bağlı olarak ya hastanın kendisi tarafından genellikle evde ya da diş hekimi tarafından klinikte uygulanırlar. Bu nedenle jel teknikleri ofis ve ev tipi diş beyazlatma olarak 2'ye ayrılırlar (Matos vd 2014).

Ofis beyazlatma, yüksek konsantrasyonda karbamid peroksit (% 35-38) ya da hidrojen peroksit (% 30-38) içeren jellerin göreceli olarak kısa sürelerde (30-45 dakika), diş hekimi kontrolünde diş minesine uygulanması esasına dayanır. Dişte hızlı beyazlatma etkisi vardır (Soares vd 2014).

Ev tipi diş beyazlatma, düşük konsantrasyonda beyazlatıcı içeren jelin hasta tarafından uygulandığı tekniktir. Jel tekniklerinin yaygın olarak kullanılmaya başladığı 1990'lı yıllarda night-guard (gece koruyuculu beyazlatma) yöntemi olarak da isimlendirilmiştir (Haywood 1991). Çünkü bu teknikte kullanılan beyazlatıcı ürünlerin, bireysel olarak hazırlanan, ağıza uyumlu bir gece plağında en az 8 saat diş yüzeyinde kalması gerekliliği nedeni ile hastanın sosyal davranışlarını etkilemeyecek en uygun zaman olarak gece periyodu düşünülmüştür. Ancak günümüzdeki daha yeni jellerde uygulama süresi düştüğü için kullanımı kolaylaşmıştır. Azami 2 hafta boyunca

uygulanabilir. Bu teknikte uygulanan beyazlatıcı ürünler %10-20 karbamid peroksit jelleri ya da daha düşük konsantrasyonda hidrojen peroksit jelleridir. %10 karbamit peroksit ile evde yapılan diş beyazlatmanın pulpa dentin kompleksi için güvenli olduğu ve daha az yan etkisi ile beraber uygun bir estetik sağladığı bildirilmiştir (Meireles vd 2008). Ancak Boushell ve arkadaşları tarafından (2012) diş hekimi kontrolünde olmaması, beyazlatma süresinin uzaması, jelin yumuşak doku ve açık dentine uygulanma riski gibi dezavantajları olduğu bildirilmiştir (Soares vd 2014).

2.1.1. Diş Beyazlatmanın Tarihçesi

Diş beyazlatmanın geçmişi 1800'lere dayanmaktadır (Dahl JE 2003). Oksalik asit, pulpa nekrozu ve kanaması ile ilişkili demir renklenmeleri için, klor, amalgam restorasyonlardan kaynaklanan bakır ve gümüş renklenmeleri için, son derece zehirli olmasına rağmen potasyum siyanür, metal restorasyonlardan kaynaklanan inatçı renklenmeler için kullanıldı. İlk kez 1884'te Harlan hidrojen dioksit ismiyle hidrojen peroksiti kullandı (Kwon ve Wertz 2015). Son zamanlarda çok çeşitli beyazlatma ürünleri olmasına rağmen hepsinin etken maddesi hidrojen peroksittir. Hidrojen peroksit tek başına veya sodyum perborat ya da karbamid ile kimyasal reaksiyon ile birleştirilmiş olarak uygulanabilir (Dahl JE 2003).

2.1.2. Diş Beyazlatıcıların İçeriği

Diş beyazlatıcıların özellikleri Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

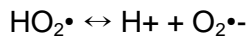
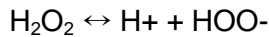
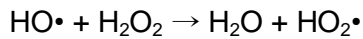
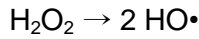
Tablo 2.1 Diş beyazlatıcı ajanların özellikleri

Diş Beyazlatıcı	Kimyasal Formül	Molekül Ağırlığı	Oranları	Etkileşim	Serbest Radikal
Hidrojen Peroksit	H ₂ O ₂	34.01 g/mol	5-40	Oksidasyon	*OH, *OOH, O* ₂
Karbamid Peroksit	CH ₆ N ₂ O ₃	94.07 g/mol	10-35	Oksidasyon	*OH, *OOH, O* ₂
Sodyum Perborat	NaBO ₃	99.82 g/mol	-	Oksidasyon	*OH, *OOH, O* ₂
Klor Dioksit	ClO ₂	67.45 g/mol	0.07	Oksidasyon	ClO ₂

(Kwon ve Wertz 2015 alınmıştır)

2.1.2.1. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Düşük molekül ağırlığı sayesinde dentine penetre olabilir. Salınan oksijen, dentin tübüllerinin içindeki organik ve inorganik bileşiklerdeki çift bağları kırar. Diş hekimliğinde %5 ile %35 arasındaki konsantrasyonlarda kullanılır (Plotino vd 2008). Hidrojen peroksitten kimyasal bağ kırıklarıyla bir dizi reaktif oksijen türleri ortaya çıkabilir. Bunlar hidroksil radikali, hidroperoksil radikali, hidroperoksil radikali anyonu, süperoksit radikali anyonu olabilir (Feinman 1991).



2.1.2.2. Karbamid Peroksit ($\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_3$)

Brotherton (1994) tarafından beyaz, kristal, katı bir madde olduğu ve su ile temasında oksijen açığa çıktığı bildirilmiştir. Beyazlatma için kullanılan konsantrasyonlar %10 ile %35 arasında değişmektedir. %10 karbamid peroksit, %3.35 hidrojen peroksit ve %6.65 üreye ayrışır. Üre de amonyak ve suya parçalanır (Fasanaro 1992). Amonyak pH'nın yükselmesini sağlar (Ribeiro vd 2006). Ürenin proteolitik özelliği beyazlatmanın etkinliğini etkiler (Arends vd 1984). Hidrojen peroksit de su ve oksijen ve reaktif oksijen türlerine ayrışır (Li Y 1996). Matis'e göre (2000) karbamid peroksit ürünleri, karbapol ve gliserin içerir. Karbopol, HP salınımını yavaşlatır böylece daha uzun süre boyunca etkili bir beyazlatma sağlanır (Kwon ve Wertz 2015).

2.1.2.3. Sodyum Perborat (NaBO_3)

Kokusuz, beyaz suda çözünen toz halinde bir maddedir (Brotherton vd 1994). 1907'den beri deterjanlar içinde, beyazlatıcı madde olarak kullanılan bir oksitleyicidir (Attin vd 2003). Kuru yerde stabil olmasına rağmen asit, sıcak hava ya da su varlığında, sodyum metaborat, hidrojen peroksit ve oksijene parçalanır (Plotino vd 2008). Sodyum perboratın, monohidrat, trihidrat ve tetrahidrat olarak farklı oksijen içeriğine sahip olan formları vardır ve her bir formunun farklı beyazlatma etkisi vardır. (Weiger vd 1994). Sodyum perborat ve distile su (2 g/1 ml) karışımının, % 16.3 hidrojen peroksite denk etkisi vardır (Wiegand vd 2008).

2.1.2.4. Klor Dioksit (ClO_2)

Klor dioksit (ClO_2), su arıtma ve ağartmada kullanılan güçlü bir oksitleyici maddedir. Yapılan in vitro bir çalışmada %0.07 klor dioksinin dişleri %35 hidrojen peroksitten daha hızlı ve etkili şekilde beyazlattığı gösterilmiştir (Ablal vd 2013).

2.1.3. Diş Beyazlatıcıların Etki Mekanizması

Diş beyazlatma mekanizması, hidrojen peroksidin diş yapısı içindeki organik kromoforlar ile etkileşimine dayanan "kromofor teorisi" ile açıklanmaktadır. Organik kromoforlar, konjuge edilmiş pi sistemlerden oluşan renkli moleküllerdir. Organik kromoforlara elektron açısından zengin bölgeleri olan aromatik bileşikler veya biyoinorganik metal kompleksler olan şelatlar örnek olarak verilebilir (McNaught ve Wikinson 1997).

Diş beyazlatma mekanizması, üç basamakta incelenebilir. İlk olarak beyazlatma ajanının diş yapılarına difüzyonu, ikincisi beyazlatma ajanının renklendirici moleküller ile etkileşimi, son olarak diş yüzey yapısının değişikliğidir. İdealde diş beyazlatırken optimal beyazlık ile beraber diş yapılarına minimal hasar verilmelidir (Kwon ve Wertz 2015).

2.1.3.1. Difüzyon

Diş beyazlatma, hidrojen peroksitin mine ve dentin içine nüfuz ederek organik kromoforlar ile etkileşimine dayanır. Diş sert dokuları, sıvılara karşı geçirgendir. Sıvı geçişi önce minede interprizmatik aralıklardan, sonra dentinde dentin tübüllerinden olacak şekildedir (Kwon vd 2012). Böylece mine ve dentin, yarı geçirgen zar gibi davranır. Fick'in difüzyon ikinci yasasına göre, bir molekülün difüzyonu yüzey alanı, difüzyon katsayısı ve konsantrasyonu ile doğru orantılı olup uzaklıkla ters orantılıdır. (Kalia ve Guy 2001). İlk kez 1987 yılındaki çalışmada çekilmiş dişlere %30 hidrojen peroksit uygulandığında pulpa odasına hidrojen peroksitin penetrasyonu tesbit edildi. (Bowles ve Ugwuneri 1987). Hidrojen peroksit difüzyonunun, sadece fiziksel olarak değil; HP'nin her bir diş yapısına göre değişen kimyasal affinitesi tarafından belirlenen konsantrasyon gradiyenti tarafından da etkilendiği bildirilmektedir (Ubal dini vd 2013).

2.1.3.2. Etkileşim

Hidrojen peroksitten kimyasal bağ kırıklarıyla bir dizi reaktif oksijen türleri ortaya çıkabilir. Bunlar hidroksil radikali, hidroperoksil radikali, hidroperoksil radikali anyonu, süperoksit radikali anyonu ve süperoksit radikali katyonu olabilir. Sulu bir ortam içinde peroksil radikali ile süperoksit radikali dengededir (Feinman 1991). Goldstein ve Garber'e göre (1995) hidrojen peroksitten reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşması sıcaklık, peroksit konsantrasyonu, pH, ve metalik katyonların varlığına bağlıdır, ROT hidrojen atomlarını kopararak renklendirici ajanların bozulmasını sağlar. Albers H.

tarafından (1991) reaktif oksijen türlerinin, renklendirici moleküller ile karşılaştığında, ikinci zincirleri basit yapılara dönüştürerek veya optik özelliklerini değiştirerek renklenmenin azaldığı izlenimini verdiği bildirilmiştir (Kwon ve Wertz 2015).

Ancak Fourier transform infrared (FTIR) ve raman spektroskopi kromoforları ve onların parçalanma ürünlerini diş yapısı içinde saptayamadığı ve hangi bölgeye özgü bir mekanizma ile beyazlatıcıların onlara nasıl bağlandıkları henüz açıklanamadığı için kromofor teorisi tam olarak desteklenememektedir (Eimar vd 2012).

Mine vücuttaki en sert mineralize dokudur. Ağırlıkça %96'sını mineral, %3'ünü su ve %1'ini organik matriks oluşturur. Mineral dengesini korumak için, mine ile oral biyofilm arasında kalsiyum fosfat apatit kristalleri sürekli, dinamik halinde değişime uğrar. Son zamanlardaki bulgular minenin organik matriksinin bir parçası haline gelmiş eksojen kaynaklı bazı organik maddeler olduğunu göstermektedir (Hegedüs vd 1999).

Nanci A. (2008) tarafından dentinin ağırlıkça %70'ini mineral, %20'sini organik matriks ve %10'nunu suyun oluşturduğu ve dentinin mineral bileşeninin küçük tabakalar şeklinde hidroksiapatit kristallerinden, organik bileşeninin ise %90 kollajen matriksten kalan kısmının ise kollajen olmayan matriks ve lipidlerden oluştuğu bildirilmiştir (Kwon ve Wertz 2015).

Hidrojen peroksit mineye içini mine proteinlerinin doldurduğu interprizmatik boşluklardan nüfuz eder (Hegedüs vd 1999). Mine ve dentinin hem organik hem de inorganik matriksinin hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri tarafından etkilendiği bildirilmektedir (Wang ve Yao 2010). Bu bulgular beyazlatma etkisinin renklendirici ajan ile beyazlatıcının etkileşimden ziyade organik maddedeki polipeptid zincirin modifiye olması sonucu olabilir diye spekülasyona yol açmaktadır. Buna uygun olarak da ileri oksidasyon süreçlerinde, hidroksil radikalleri ile organik maddenin etkileşimi sonucu ara maddeler ve karbon dioksit ve su gibi zararsız türler ortaya çıkar (Khataee vd 2009). Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) ve FTIR kullanılarak yapılan çalışmalarda dentin ve minedeki morfolojik değişikliklerin mine matriks proteinin ya da dentin organik bir matriksinin parsiyal lizisi sonucu olduğu bildirilmiştir. Diş beyazlatma sonrası katepsin B ve matriks metalloproteinazda proteolitik aktivitede önemli artışlar olması dişteki dinamik değişimleri göstermektedir (Sato vd 2013). Birçok çalışmanın peroksit bazlı maddelerin, klinik açıdan mine ve dentinin kimyasını etkilemediğini veya florür ve kalsiyum ilavesi ile engellenebilir olduğunu göstermesine rağmen (Rodrigues vd 2007) bazı çalışmalar da kalsiyum/fosfat oranında görülen önemli değişikliklerin inorganik bileşenlerin etkilendiğini gösterir diye bildirmektedir (Efeoglu vd 2005). FTIR analizi kullanarak yapılan çeşitli çalışmalarda hidrojen peroksitin mine ve dentinden hem karbonat hem de proteinlerin kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Sato vd 2013).

Mikrobilgisayarlı tomografi ile %35 karbamid peroksitin minede 250 µm derinliğe kadar demineralizasyona neden olduğu dentini etkilemediği gösterilmiştir (Efeoglu vd 2005).

Yapılan çalışmalar hidrojen peroksitin, mine ve dentinin tüm bileşenleri ile etkileşim potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Bu etkileşimin klinik önemi ve diş beyazlatma ile ilişkisinin nasıl olduğunu değerlendirilecek daha ileri çalışmalara gereksinim vardır (Kwon ve Wertz 2015).

2.1.3.3. Yüzey Değişimi

Peroksit bazlı malzemeler ile diş beyazlatma, beyazlatıcının diş yapısı içine hareketi ile başlayan, burada renklendirici moleküller ile etkileşimine dayanan ve diş yüzeyindeki mikromorfolojik değişikliklerin sonucu dişin optik özelliklerinin değiştiği dinamik bir süreçtir. Etkileşimin sadece organik renklendirici moleküller ile değil aynı zamanda mine ve dentin yapıları ile de olduğu bildirilmiştir (Kwon ve Wertz 2015).

2.1.4. Diş Beyazlatıcıların Diş Üzerine Etkileri

2.1.4.1. Mine ve Dentin Yüzeyine Etkileri

Yapılan çalışmalarda %35 HP (Suliman vd 2004), %35 CP (Worschech vd 2003), %6.5 HP (Duschner vd 2006), %6.0 HP (Nucci vd 2004), %25 CP (Slezak vd 2002), %15 CP (Çobankara vd 2004), %10 CP'in (Moraes vd 2006) uygulanması ile mine ve dentin yüzey morfolojisinde anlamlı değişiklik olmadığı bildirilmiştir. %10 CP, 250 saat uygulandığında yüzey morfolojisinde kontrol grubu ile anlamlı farklılık olmadığı bildirilmiştir (Haywood vd 1991). %10 CP, 14 gün uygulandığında mine porozitesinde hafif artış olduğu ancak beyazlatmadan 3 ay sonra normale döndüğü bildirilmiştir (Türkün vd 2002). İn vitro olarak sığır dişlerine %35 HP'in 40 dakika uygulanması ile mine yüzeyinde erozyon olmadığı ve beyazlatıcıya kalsiyum ilavesi ile minenin erozyona direncinin artabileceği bildirilmiştir (Borges vd 2012). İnsan dişlerinde %10 CP ve %16 CP günde 8 saat 6 hafta boyunca uygulandığında minenin kimyasal kompozisyonunda anlamlı değişiklik olmadığı bildirilmiştir (Oltu vd 2000).

Bazı in vitro çalışmalarda HP ve CP uygulanması sonucu mine yüzeyinde bazı alanlarda oyuklar tesbit edilmiştir (Yeh vd 2005). Spalding ve arkadaşları, 20 dakika %35 HP ve ardından 1 hafta günde 12 saat olmak üzere %10 CP uygulaması sonucu mine yüzeyinde minör değişiklikler olduğunu bildirmişlerdir (Spalding vd 2003). Zalkind ve arkadaşları, yüksek asidik olan %30 HP'in 7 gün uygulanması sonucu minede morfolojik değişiklikler olduğunu bildirmişlerdir (Zalkind vd 1996). Erdemgil'in yaptığı

çalışmada, %10–16–35 konsantrasyonlarında CP içeren beyazlatma ajanlarının uygulanmasıyla dişlerden çözeltiliye geçen kalsiyum miktarı atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile ölçüldüğünde zaman ve konsantrasyona paralel olarak kalsiyum kayıplarının arttığı saptanmıştır (Erdemgil vd 1996).

Yapılan çalışmalarda diş beyazlatmada mine yüzeyinde deproteinizasyon, demineralizasyon ve oksidasyon aracılığıyla oluşan mikro morfolojik değişimler sonucu mine saydamlığındaki değişiklikler bildirilmiştir (Eimar vd 2012). Başka çalışmalarda beyazlatmanın diş yüzeyi topografisini değiştirmedığı bildirilirken (Türkün vd 2002) diğer birçok çalışmada da değiştirdiği bildirilmiştir (Hosoya vd 2003). Raman spektral analiz yapıldığında diş beyazlatma sırasında diş yüzeyinde mineral kaybı ve değişikliklerden ziyade mine organik matrikste bir azalma gözlenmiştir (Eimar vd 2012).

Beyazlatmayı takiben dentin morfolojisi SEM (scanning electron microscope) ile incelendiğinde anlamlı değişiklikler gözlenmemiştir (Duschner vd 2006). Zalkind ve arkadaşları, 7 gün boyunca %10 CP veya %30 HP uygulanması sonucu dentinde morfolojik değişiklikler olduğunu bildirmişlerdir (Zalkind vd 1996).

2.1.4.2. Mine ve Dentin Mikrosertliği Üzerine Etkileri

Mikrosertlik mine ve dentin yüzeyinin mekanik özelliklerini ifade eder. Diş yapısından mineral kaybını ya da mineral kazanımını belirtir. %35 HP (Suliman vd 2004), %12 HP (Pugh vd 2005), %6–9,5 HP (Teixeira vd 2004), %10 CP (Leonard vd 2005), %12 CP (Akai vd 2001), %15 CP (Ünlü vd 2004), %20 CP (White vd 2002), %25 CP (Slezak vd 2002), %37 CP (Cesar vd 2005) uygulanan çalışmalarda mine mikrosertliğinde anlamlı değişimler gözlenmemiştir.

Smidt ve arkadaşları, pH 4,3 ve 5,5 olan iki ayrı pH daki %10 CP'in günde 6 saat 16 gün boyunca uygulanmasıyla mine mikrosertliğinde hafif azalma olduğunu bildirmişlerdir (Smidt vd 1998). %30 HP, 24 saat uygulandığında mine mikrosertliğinde azalma bildirilmiştir (Hairul Nizam vd 2005). %35 HP veya %35 CP uygulanan çalışmalarda mine mikrosertliğinde azalma bildirilmiştir (Attin vd 2004).

İnsan dişlerine %35 HP ve %35 CP uygulanan bir çalışmada, mine mikrosertliğinde azalma olduğu ve bu azalmanın %0,05 flor solüsyonu uygulaması ile normale döndüğü bildirilmiştir (Lewinstein vd 2004). %10 CP uygulanan çalışmada azalan mine mikrosertliğinin remineralizasyon ajanı kullanılarak 7 günde normale döndüğü bildirilmiştir (Basting vd 2005).

Dişe %35 HP (Suliman vd 2004), %35 CP (Attin vd 2004), %10 CP ve %15 CP (Ünlü vd 2004), %6 HP ve %6,5 HP (Duschner vd 2006) uygulanan çalışmalarda dentin mikrosertliğinde anlamlı değişiklik olmadığı bildirilmiştir.

Diş pH'sı 2 olan %30 HP uygulaması sonucu dentin mikrosertliğinde azalma olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur (Chng vd 2005). Bazı çalışmalar azalan dentin mikrosertliğinin remineralizasyon periyodundan sonra normale döndüğünü bildirmişlerdir (De Freitas vd 2004).

2.1.4.3. Mine ve Dentin Ultrastruktürüne Etkileri

Diş beyazlatıcıların, mine ve dentinin ve mine dentin birleşiminin alt tarafındaki ultrastruktürdeki etkilerini incelemek için konfokal lazer tarama mikroskobu kullanılmaktadır. Beyazlatılmış diş örnekleri incelendiğinde mine ve dentinin ultrastruktüründe değişiklik gözlenmemiştir (White vd 2000). Tam tersine; %10 CP uygulanan insan diş örnekleri bilgisayarlı mikrotomografi yöntemi ile incelendiğinde 50 µm'yi bulan, anlamlı demineralizasyon bulunmuştur (Efeoglu vd 2005).

Çalışmaların çoğunluğu göstermektedir ki; genel olarak, HP ve CP içeren ürünlerin mine ve dentin ultrastruktürü üzerine anlamlı zararlı etkileri yoktur. Ama in vitro şartlarda mine dentin ultrastruktürüne olumsuz etkileri gösterildiğinde in vivo şartları taklit edemediği düşünülmüştür (Joiner vd 2007).

2.1.4.4. Pulpa Üzerine etkileri

Literatüre göre diş beyazlatma sırasında HP pulpaya difüze olmaktadır (Hanks vd 1993, Coldebella vd 2009, Soares vd 2014). HP'nin pulpa odasına difüze olan miktarı konsantrasyon ve uygulama zamanına bağlı olarak değişmektedir (Benetti vd 2004). Evde beyazlatma jelleri, uygulandıktan 5-15 dakika sonra pulpada gözlenmiştir (Anderson vd 1999). Bu durumda pulpadaki sinirler etkilenip hastada diş hassasiyeti yaşanabilmektedir. Pulpada enflamatuar medyatörlerden bradikinin (Lepinski vd 2000) ve P maddesinin (Caviedes-Bucheli vd 2008) ekspresyonunun ağrıya yol açtığı bildirilmiştir.

Beyazlatma seans sayıları ve beyazlatıcı konsantrasyonları arttırıldığında özellikle mine dentin kalınlığının az olduğu alt keser dişlerde daha fazla hassasiyet problemi yaşanmaktadır (Costa vd 2010, Roderjan vd 2014). İnsanda (1×45 dakika) ve (3×15 dakika) HP uygulanması ile pulpada bazı bölgelerde nekroz ve mononükleer hücrelerin neden olduğu hafif enflamatuar cevap ve damarlarda tıkanıklık gözlenmiştir (Costa vd 2010). Cintra ve arkadaşları, sıçan keser dişlerine HP'in 45 dakika boyunca 15 dakikada bir yenilenerek uygulanmasının; 45 dakika boyunca yenilenmeden uygulanmasından pulpa için daha zararlı olduğunu bildirmişlerdir (Cintra vd 2013). Ayrıca beyazlatmaya bağlı olarak sıçan keser dişlerin pulpasında vasküler

permeabilitede artış gözlenmiştir (Ferreira vd 2013). İnsanlarda 45 dakika %38 HP uygulandığında alt keser dişlerde koronal pulpada parsiyal nekroz ve kök pulpasında orta dereceli enflamatuar cevap gözlenirken (Costa vd 2010). Aynı çalışma köpeklerde yapıldığında şiddetli enflamasyon sonucu artmış tamir dentini, odontoblast tabakasında incelme, enflamatuar infiltrasyon ve internal kök rezorpsiyonu gözlenmiş olup; bulgulardan enflamasyon ve kanlanmanın 60 gün sonra normale döndüğü gözlenmiştir (Seale vd 1981). Sıçanlarda %35 HP 45 dakika uygulanması ile pulpa boynuzlarının kenarında nekroz gözlenmiştir (Cintra vd 2013). İnsan premolarlarının pulpalarında %38 HP patolojik değişikliğe neden olmamıştır (Kina vd 2010).

Yüzde iki kalsiyum glukonat içeren beyazlatıcıların, içermeyenlere oranla pulpada daha az ve yüzeysel nekroz alanlarına neden olduğunu içermeyenlerinse geniş ve tüm pulpa boynuzlarını kapsayan nekroza neden olduğunu bildirmişlerdir (Roderjan vd 2015). Kalsiyum içeren beyazlatıcılar, beyazlatma boyunca (45 dakika) pH'nın 8-9 civarında kalmasını sağlar (Freire vd 2009). Kalsiyum içermeyen beyazlatıcıların aktive edildiğinde 45 dakikalık beyazlatma boyunca pH'nın 6-7 den 5'e kadar düştüğü bildirilmiştir (Marson vd 2008).

2.1.5. Diş Beyazlatıcıların Yumuşak Dokular Üzerine Etkileri

Diş beyazlatma sırasında hastalar tarafından bildirilen en genel yumuşak doku problemleri, gingiva veya mukozanın minör ülserasyonları ve irritasyonlarıdır. Şikayetler hastalar tarafından hafif ve geçici olarak tarif edilmiştir (Ghalili vd 2014). Gingival irritasyonun başlıca nedeni ise, mevcut plağın uyumsuzluğu, plağın giriş yolunun uygun olmayışı ve peroksidin kimyasal yapısıdır. Haywood günde iki saat kullanılarak 6 hafta süresince uygulanan beyazlatma tedavisi sonrasında bile gingival soruna rastlanmadığını ileri sürmüştür (Haywood vd 1991).

2.1.6. Diş Beyazlatıcılar ve Diş Hassasiyeti

Diş beyazlatma nedeniyle gelişen diş hassasiyetinde nosiseptörlerin aktivasyon mekanizması bilinmemektedir. Normalde dentin hassasiyeti, sağlıklı dişlerdeki ekspozite dentine soğuk uyarıların teması sonucu oluşur. Uyarılar etkisi ile dentin tübülleri içindeki sıvı yer değiştirerek derin dentin ve pulpadaki mekanosensitif sinirlerin uçlarını uyarır. Diş beyazlatma nedeniyle gelişen diş hassasiyetinde ve dentin hassasiyetinde ağrı mekanizmalarının farklı olduğu varsayılmaktadır. Son zamanlarda kemosenitif iyon kanalı olan TRPA1'in fonksiyonel özellikleri tanımlanmıştır. Bu kanal, hidrojen peroksit dahil olmak üzere çeşitli oksitleyici bileşikler tarafından aktive edilir. Ayrıca

pulpal duyu ileticileri (aferentleri) de TRPA1'i eksprese ederler. Diş beyazlatma sonucunda görülen diş hassasiyetinin mekanizmasının, TRPA1 yoluyla intradental sinirlerin direkt aktivasyonu sonucu olduğu varsayılmaktadır (Markowitz K. 2010).

Diş hassasiyeti, pulpa hücrelerinin diş beyazlatıcı ile maruziyetine bağlı olarak şiddeti değişebilen geri dönüşümlü enflamatuar bir durumdur (Goldberg vd 2010). Bazı sitotoksisite çalışmaları göstermiştir ki hücresel yanıt hücre tipine göre değişmektedir (Zhu vd 2012). Klinik çalışmalardaki HP toksisite sonuçları in vitro çalışmalardaki toksisiteden daha az gözlenebilir. Çünkü vital dişlerde diş eti oluşu sıvısının, dentin tübüllerinde kollajenlerin ve odontoblastların sitoplazmik uzantılarının varlığı beyazlatma ajanlarının, dental materyallerin ve bakterilerin etkilerini minimize etmeye çalışır (Goldberg vd 2010). Ekstra sellüler matriks, antioksidanlar ve lenfatik sistem varlığında pulpa hücreleri dış etkenlere karşı kendilerini koruyabilirler (Bowles vd 1992, Esposito vd 2003, Sauro vd 2007).

2.1.7. Diş Beyazlatıcıların Toksisitesi

Pulpada HP ve onun bozulma ürünleri olan hidroksil iyonlarının serbest radikal olarak oksidatif strese neden olduğu bildirilmiştir (Kawamoto vd 2004). Reaktif oksijen türlerindeki artış sonucu gelişen lipid peroksidasyon ve protein bozulması sonucu hücrelerde membran hasarı, mutagenез, karsinogenез, gözlenmiş (Martindale vd 2002) ve hücre proliferasyonunun azaldığı; nekroz ve apoptoz geliştiği bildirilmiştir (Allen vd 2000). Odontoblast benzeri hücreler olan MDPC-23'e uygulanan %10 HP'in hücre canlılığının azalmasına (Soares vd 2015), %16 CP'in hücre metabolizmasının azalmasına neden olduğu bildirilmiştir (Soares vd 2011). Ayrıca %35 HP'in hem halojen ışık ile birlikte hem de halojen ışıksız olmak üzere uygulanması sonucu ışık uygulandığı zaman hücre metabolizmasında ve total protein miktarında uygulanmayana oranla daha fazla azalma ve morfolojik değişiklikler gözlenmiştir (Trindade vd 2009).

%20 ve %35 HP'in sıçan molar dişlere 15 dakikaya kadar olan uygulamalarından 2 gün sonra pulpanın oklüzal üçlüsünde enflamatuar hücreler gözlenmiştir. 30-45 dakikalık uygulamalardan 2 gün sonra enflamatuar hücrelerin azalmasıyla beraber nekrotik alanlar gözlenmeye başlamıştır. 30 gün sonra enflamasyon gözlenmemekle beraber pulpa odasında daralma ve tersiyer dentinde artış gözlenmiştir (Cintra vd 2016).

Ortodontik amaçla çekilecek dişler, %38 HP ile hem ışıklı hem de ışıksız beyazlatıldıktan sonra, çekilerek incelendiğinde normal histolojik bulgular gösterdiği bildirilmiştir (Kina vd 2010).

2.1.8. Diş Beyazlatmayı Etkileyen Faktörler

Hidrojen peroksit, uzun süre boyunca hiç yenilenmeden uygulansa bile sürekli aşırı difüzyonu gözlenmiştir (Kwon vd 2013). Ayrıca diş beyazlatıcıların kimyasal aktivatör içermesi, hidrojen peroksitin diş yapılarına penetrasyonunda azalmaya neden olmasına rağmen beyazlatma etkinliğinde belirgin artış gözlenmiştir (Torres vd 2010). Başka bir çalışmada hidrojen peroksit penetrasyonu ile beyazlatmanın etkinliği arasında ilişki gözlenmemiştir (Kwon vd 2013) Difüzyon yasasına uygun olarak; hidrojen peroksit penetrasyonu, yüksek konsantrasyonda hidrojen peroksit uygulanarak, uzun süreli hidrojen peroksit uygulanarak (Kwon vd 2015, Hanks vd 1993), yüksek sıcaklıkta hidrojen peroksit uygulanarak (Rotstein vd 1991), genç dişlerdeki büyük boyutlu açıklıkların bulunduğu dentin tübülleri yoluyla (Camps vd 2007), konumu nedeniyle diş yapısındaki değişikliklere bağlı olarak, asit-aşındırma veya restorasyon yapılıp yapılmamasına bağlı olarak (Palo vd 2012) ve ışık ile aktivasyon sonucu (Camargo vd 2009) arttırılabilir bulunmuştur. Bu çalışmalar, ağız içini ve vital dişlerin sahip olduğu pozitif pulpa basıncını taklit edemediği için klinik sonucu belirsizdir (Hanks vd 1993).

2.1.9. Diş Beyazlatmanın Yan Etkileri

En yaygın yan etkilerinin orta şiddetten yüksek şiddette kadar değişen diş hassasiyeti (Reis vd 2011, He vd 2012) ve gingivitis olduğu bildirilmiştir (Armênio vd 2008). Bu duruma daha çok pulpa odaları ve dentin kanalları daha geniş olan genç dişlerinde ve ince mine ve dentine sahip olan keser dişlerde olduğu bildirilmiştir (Bonafé vd 2013). Bunun sonucunda daha fazla oranda beyazlatıcı ürünün pulpaya ulaşması söz konusudur. Ayrıca kompozit, cam-iyonomer, kompomer restorasyona sahip dişlerde, eksik restorasyonu, servikal abrazyonu, atrisyonu, diş eti çekilmesi ve hassasiyeti olanlarda, daha fazla oranda beyazlatıcı ürünün pulpa odasına penetre olduğu yan etkilere ve sitotoksositeye neden olduğu bildirilmiştir (Hanks vd 1993, Kwon ve Wertz 2015). Tedaviye birkaç gün ara verildiğinde bu yan etkilerin geçtiği bildirilmiştir (Haywood ve Heyman 1991).

2.2. Kök Hücre

Kök hücreler, vücudun ana hücreleridir. İki tip kök hücre vardır:

1. **Embriyonik kök hücre:** Bu hücreler embriyodan elde edilir ve dört beş fertilize yumurtadan veya blastositten yaklaşık 50-150 hücre elde edilebilir. Bu hücreler iki yüz yirmi tip hücreye farklılaşabilir.
2. **Yetişkinden elde edilen, erişkin kök hücre:** Bu hücreler organ ve dokuların derinlerinde diffüz olarak bulunur. Kaza veya hastalık sonucu hasar gören dokunun yenilenmesinde ve yerine konmasında görevlidirler.

Kök hücreler:

1. Kendini yenileyebilirler. Farklılaşmadığı zaman sayısız hücre bölünmesi döngüsünü yapabilir, kendi kendine çoğalabilirler.
2. *In vitro* şartlarda 1-7-14-21 günde çoğalabilirler.
3. Özelleşmiş hücre tipine farklılaşabilirler.

Erişkin kök hücreler, kayıp hücrelerin yerini doldurmak üzere prekürsör ya da projenitör (öncü) olarak adlandırılan ara hücreleri oluştururlar. Tamamen özelleşmiş hücrelere farklılaşmaya kadar hücre bölünmesi ve maturasyonu (olgunlaşması) devam eder. Erişkin kök hücreleri, kaynağına ve potansiyeline göre belirtilir. Multipotenttirler çünkü bir veya daha fazla özelleşmiş hücre dizilerine farklılaşabilme potansiyelleri vardır. Kemik iliğindeki ve diş pulpasındaki, mezenşimal kök hücre olarak adlandırılan kök hücreler, kemik, kıkırdak, yağ, kas ve bağ dokunun tüm hücre tiplerini üretebilirler. Bir bölgeden alınan kök hücreler tamamen farklı bir dokunun hücre tipine manipüle edilebilirler. Bu özelliğine transdiferansiyasyon veya plastisite denir. Değişik tipteki erişkin kök hücreleri, farklı derecelerde plastisiteye sahiptir (WEB_1).

2.2.1. İnsan Diş Kök Hücresi

Diş kök hücrelerini de içeren kranyofasiyal kök hücreler, nöral krest ve mezenşimal hücrelerden köken alır. Nöral krest hücreleri, nöral dokudaki projenitör hücreler ile aynı orijinden gelir (WEB_1).

Ortodontik amaçla, 12-14 yaşlarında çekilen apeksi kapanmamış premolar dişlerin ve 18'li yaşlarda çekilen apeksi kapanmamış akil dişlerinin apikal bölgesi, sürmemiş dişlerin foliküler dokusu diş kök hücresi kaynaklarıdır. Diş kök hücresi, sağlıklı diş pulpasından, gelişmekte olan dişlerin apikal bölgesini de içeren periodontal ligamentten ve diğer diş yapılarından (süt dişinden, apikal papilladan) elde edilir (WEB_1).

Dentin-pulpa benzeri kompleks oluşturabilen, erişkin insan diş pulpası kök hücresi (DPSC), ilk kez Gronthos ve arkadaşları (2000) tarafından izole edilmiştir. Miura ve arkadaşları (2003) süt dişi pulpasından kök hücre izole etmişlerdir.

Beş tip, erişkin insan diş kök hücresi izole edilmiştir:

1. Diş pulpası kök hücresi veya dental pulpa kök hücre Gronthos ve arkadaşları tarafından (2000)
2. Çekilmiş süt dişinden elde edilen kök hücresi veya çekilmiş süt dişi kaynaklı kök hücre (SHED) Miura ve arkadaşları tarafından (2003)
3. Periodontal ligament kök hücresi veya periodontal ligament kaynaklı kök hücre (PDLSCs) Seo ve arkadaşları tarafından (2004)
4. Diş folikülü öncü hücresi veya dental folikül prekürsör hücre (DFPCs) Morscbeck ve arkadaşları tarafından (2005)
5. Apikal papilladan elde edilen kök hücre (SCAP) Sonoyama ve arkadaşları tarafından (2006) izole edilmiştir (Şekil 2.1).

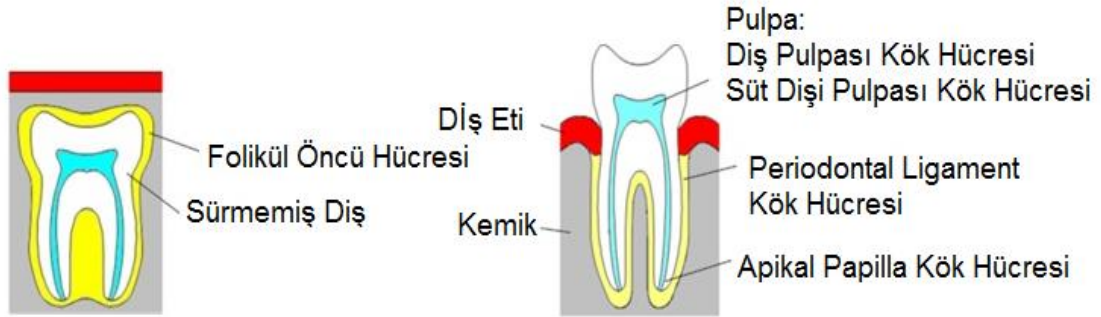
Bu hücreler, mezenşimal kök hücreler ile benzer özellikler gösterirler örneğin kendilerini yeniler ve farklılaşma potansiyelleri vardır. Diş (dental) kök hücreleri, odontojenik hücrelere dönüşme ve diş pulpasını ve periodontal dokuyu yenileme kapasitesine sahiptir. Aynı zamanda kondrojenik, osteojenik, nörojenik, miyojenik, hepatojenik, adipojenik ve insülin üreten hücrelere diferansiye olma yani farklılaşma kapasitesine de sahiptir. Diş (dental) kök hücrelerinin üç germ hattına (adipojenik, nörojenik ve osteo/odontojenik) diferansiye olması, diş dokularındaki pluripotent kök hücrelerin varlığını kanıtlar (WEB_1).

Diş (dental) kök hücreleri ile diş implantları, kemik tamiri yani yenilenmesi, nörodegeneratif hastalıklar, kalp hastalıkları ve diyabet gibi klinik problemlere çözüm geliştirmek için çalışmalar yapılmaktadır (Mayo vd 2014).

İki çeşit yetişkin diş kök hücresi tanımlanmıştır. Mezenşimal kök hücre benzeri hücreler (MSC) ve epitel ya da epitelyal kök hücreler. İnsanda henüz epitel ya da epitelyal kök hücreler tanımlanmamıştır bunlar sadece farelerde tanımlanmıştır (Harada vd 1999).

Mezenşimal kök hücreler, kemik iliği kök hücreleri gibi adipojenik, nörojenik ve osteo/odontojenik hücre hatlarına diferansiye olabilirler. Shi ve Gronthos, DPSC'lerin perivasküler and perinöral kılıf bölgelerinde bulunduğunu bildirirken, Chen ve ark. PDLSC'lerin, ve Sonoyama ve ark. SCAP'ın perivasküler bölgede küçük kılıflar içinde lokalize olduğunu bildirmişlerdir (Sonoyama vd 2006, Chen vd 2006).

Diş dokusu kaynaklı kök hücrelerin adipogenez ve kondrogenez potansiyeli kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücrelere oranla daha azdır. Diş kök hücreleri nöral krest kaynaklı olduğu için nörogenez kapasitesi kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücrelere oranla daha fazladır (Huang vd 2009).



Şekil 2.1 Dişten elde edilen kök hücreler (Mayo vd 2014)

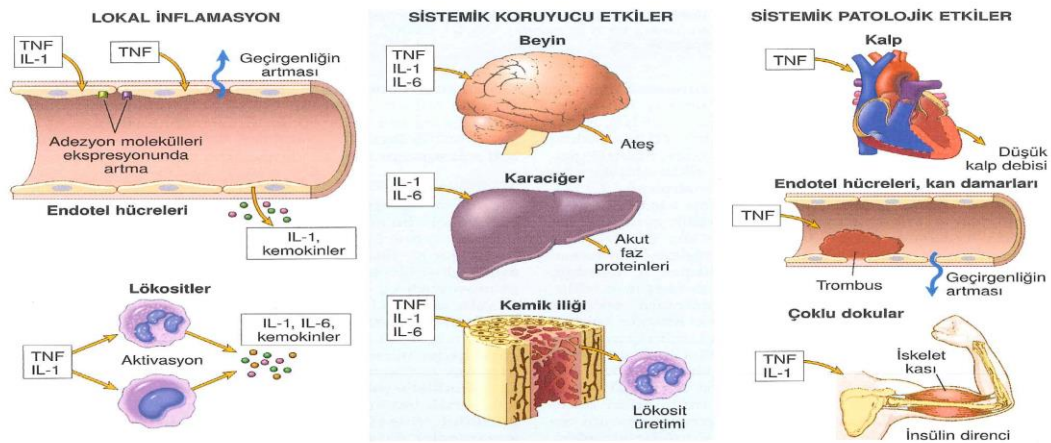
2.3. Sitokinler

Sitokinler, inflamasyon ve bağışık yanıtlarında aracı olarak fonksiyon gören birçok hücre tipinin polipeptid yapısındaki ürünleridir. Zararlı uyarılara karşı gelişen en erken bağışıklık ve inflamasyon reaksiyonlarında, ayrıca mikroplar karşısında daha geç gelişen adaptif (spesifik) bağışıklık reaksiyonlarında rol oynarlar. TNF-alfa, IL-1, IL-6 akut enflamasyonda rolü olan bir grup sitokindir (Şekil 2.2). TNF ve IL-1, aktive makrofajlar, ayrıca mast hücreleri, endotel hücreleri ve bazı diğer hücre tipleri tarafından üretilir. Bunların salgılanması, bakteri toksinleri, immun kompleksler ve adaptif bağışık yanıtları sırasında T lenfositlerin ürettiği ürünler tarafından uyarılır. Bu sitokinlerin enflamasyondaki başlıca görevi, endotel aktivasyonudur. TNF ve IL-1, endotel hücreleri üzerinde adezyon moleküllerinin ekspresyonuna yol açar. Bunun sonucunda lökositlerin bağlanması ve toplanması artar ve özellikle kemokinler olmak üzere ek sitokinlerin, ayrıca eikozanoidlerin üretilmesi ile sonuçlanır. TNF, endotelin trombojenik özelliğini de artırır (Kumar vd 2013).

İnsan tumor nekroz faktör alfa, kaşektin olarak da adlandırılır. 157 amino asitli bir polipeptiddir. En çok aktive olmuş makrofajlardan üretilir. Makrofajların TNF- α üretmesi için potansiyel stimulus LPS'dir. TNF- α , B hücrelerinden antikor üretimini düzenler ve sitotoksik T hücrelerini stimüle eder. Lipoprotein lipazı ve adiposit gen ekspresyonunu inhibe eder (Beutler vd 1987, Tracey vd 1987, Lekutis vd 1997).

İnsan interleukin 6 (IL-6), 184 amino asitli bir polipeptiddir. T ve B hücrelerinden, monositlerden, fibroblastlardan, keratinositlerden, endotel hücrelerinden, mesenşimal hücrelerden, astrositlerden, kemik iliği stroma hücrelerinden, bazı tumor hücrelerinden salgılanır. IL-6, immun sistemde, hematopoezde ve enflamasyonda çeşitli hücrelerin büyümesini ve diferansiyasyonunu düzenler. Bu işlemler, IL-5, TNF, PDGF, IFN gibi bazı sitokinler ile indüklediği veya sadece IL-6'nın (kendisinin) indüklediği karmaşık sitokin ağı ile entegre olarak gerçekleştirilir. Sonuçta IL-6, diğer sitokinler (IL-1, IL-2, IL-

3, IL-4, IL-5, IFN- γ , GM-CSF, M-CSF, CSF v.s.) ile sinerjik veya antagonist etki oluşturur. IL-6, B hücrelerinin olgunlaşım antikor oluşturan hücrelere dönüşümünü indükler. Ayrıca diğer sitokinler ile birlikte T hücrelerinin büyümesini ve sitotoksik T hücrelerinin diferansiyasyonunu ve multipotent hematopoetik progenitörleri sitümüle eder. Megakaryosit gelişimini destekler. IL-6, enflamasyon ya da doku hasarına cevapta akut faz reaksiyonlarının major indükleyicisidir. IL-1 ve TNF ile birlikte hepatositlerden akut faz proteinlerinin sentezini indükler. Her bir sitokin veya kombinasyonu akut faz proteinlerinin üretiminde seçici davranır. IL-6, ACTH üretimini uyarır. Bu da nöroendokrin sistem ile ilişkisini açıklar. Sonuç olarak IL-6 dokularda endokrin, parakrin ve otkrin olarak çok yönlü etkili bir sitokindir (Chehimi vd 1994, Sakamoto vd 1994, Moscovitz vd 1994, Kinter vd 1995).



Şekil 2.2 TNF ve IL-6'nın etkileri (Kumar vd 2013)

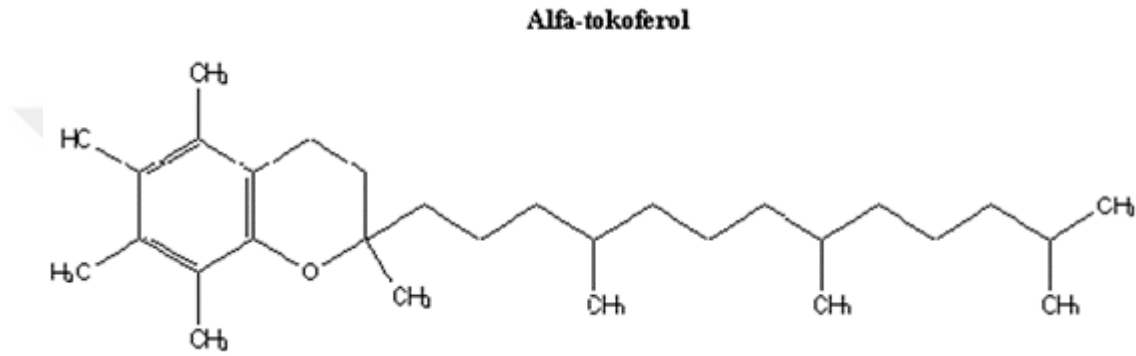
2.3.1. Diş Dokusunda Üretilen Sitokinler

Diş pulpası, dentin ile kapatılmış gevşek mezenşimal dokudur. Hücreler ve damar sinir paketi içerir. Mekanik, kimyasal, mikrobiyal iritanlar ve travma, pulpal enflamasyona yani pulpitise neden olur (Love ve Jenkinson 2002, Yu vd 2009). Leprince ve arkadaşlarına (2012) göre bunlar pulpada önce odontoblast hücreleri ile karşılaşırlar. Veerayutthwilai ve arkadaşlarına (2007) göre bu hücreler, alttaki dokuya bariyer görevi görür (Yazid vd 2014). Nair'e (2004) göre periapikal lezyon mikroorganizmalar ve konağın periodontal ligament ve kök kanal hücrelerinin etkileşiminden kaynaklanır. Stashenko ve arkadaşlarına (1998) göre bu etkileşim sitokinler, litik enzimler ve enflamatuar hücrelerin üretimi ve osteoklastik aktivasyon ile sonuçlanır. Nair PN (2004), Hannas ve arkadaşlarına (2007) göre lokal enflamasyon ve kollajen ve diğer ekstraselluler matriks proteinlerini de kapsayan mineralize ve mineralize olmayan periapikal dokularda yıkım olur (Sousa vd 2014). Brackett ve arkadaşlarına göre (2011) periapikal iyileşme sırasında makrofajlar interleukin (IL)1b, IL6, IL8, IL10, IL12 ve tumor nekroz faktör alfa (TNF α) gibi sitokinleri salgırlar ve

bunlar periapikal enflamasyonda, kemik rezorpsiyonunda ve kemik iyileşmesinin inhibisyonunda arbuluculuk yaparlar (Diamode vd 2014).

2.4. E Vitamini

E vitamini, formülü $C_{29}H_{50}O_2$ olan, α , β , γ ve δ olmak üzere 4 izomeri olan bir bileşiktir. Birçok yiyecekte bulunan, yağda çözünen bir besin maddesidir. Bitkisel yağlarda, fındıkta ve yağlı, nişastalı tohum olan çamfıstığında, zenginleştirilmiş kahvaltılık tahıllarda, ıspanak, brokoli, kivi, mango dahil olmak üzere bazı gıdalarda bulunur (WEB_2).



Şekil 2.3 Alfa tokoferolün yapısı

1922'de Evens ve Bishop, sıçanlarda çeşitli tahılların yağlarının tüketilmesi ile (diet) besin eksikliği nedeniyle oluşan fetal rezorpsiyonun düzeldiği bildirilmiştir. Döllenmedeki vital rolü nedeniyle bilinmeyen bu maddeye antisterility (kısırlığa karşı) faktör anlamında Yunancadan 'tokoferol' kelimesi kullanılmıştır. 'Toko' çocuk doğurma 'fero' getirmek anlamındadır. Ayrıca tokoferoller (TOH) ve tokotrienoller (T3), α -, β -, γ - ve δ -formları ile birlikte vitamin olarak karakterize edildi (Shamim vd 2015).

Badem, fındık, buğday tohumu yağı ve ayçiçeği yağı yüksek oranda α -TOH içerir (Schmölz vd 2016). E vitamininin alfa-tokoferol formu, yapısal olarak sekiz doğal lipofilik molekülü kapsar ve diyetle en yaygın olarak bulunan şeklidir (Şekil 2.3). Piyasada bulunan E vitamini takviyeleri, biyolojik olarak en etkili form olan alfa-tokoferol formundadır (Simonson W 2014).

Bu vitamin, vücuttan toksik olan serbest radikalleri temizleyen bir antioksidan olarak sınıflandırılır. Antioksidanlar, oksijen metabolizması sırasında açığa çıkan serbest radikallerin yol açtığı zararlardan hücreleri koruyan maddelerdir. Ayrıca metabolik ve inflamatuvar olaylar ile ilişkili özel sinyal yollarını ve genlerini düzenler (Simonson W 2014). E vitamini, DNA hasarını onarmaya, işgalci bakteri ve virüsleri uzaklaştırmaya ve aynı zamanda bağışıklık sistemini güçlendirmeye, kan damarlarının

genişlemesine ve kanın damar içinde pıhtılaşmamasına yardımcı olur. Buna ek olarak, hücreler, E vitaminini birbirleri ile etkileşim ve çok önemli fonksiyonları gerçekleştirmek için kullanmaktadır (WEB_2).

2.4.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, vücut tarafından yediklerimizden enerji elde ederken ve hücre ya da organizmanın (yaşam süreçleri yani) metabolik faaliyetleri için gerekli olan temel maddeler üretmek için yapılan kimyasal reaksiyonlar sonucu oluşur. İnsanlar, sigara dumanı, hava kirliliği, güneşten gelen ultraviyole ışık ve X-ışınları gibi çevresel faktörler nedeniyle de serbest radikallere maruz kalmaktadır. Serbest radikalleri kararsız kılan en az bir tane eşleşmemiş elektronu vardır. Serbest radikal, kararlı olmak için bir başka atomdan bir elektron alır. Fakat bu durumda atom aldığı bileşik kararsız olur ve hücrelere zarar veren bu reaksiyonlar zincirleme şekilde devam eder. Serbest radikaller, genetik değişikliklere (mutasyon) neden olur, kanser, kalp hastalıkları, Alzheimer, Parkinson ve Lou Gehrig gibi yaşla ilişkili (geriatrik) hastalıklarda rol alabilir. Serbest radikaller, aynı zamanda faydalıdır; mikroorganizmaların öldürülmesinde, hormon ve kimyasal habercilerin hücreler ile iletişimde rol alır (WEB_2).

2.4.2. Oksidatif Hasar

Oksidatif DNA hasarları en sık görülen DNA hasarlarıdır. Hücrede metabolik ve diğer biyokimyasal reaksiyonlar sonucu ve çevresel faktörler nedeni ile sürekli olarak reaktif oksijen türleri (ROT) oluşmaktadır. Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali (OH^{\bullet}), hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri DNA hasarlarına neden olur (De Bont vd 2004). Hidroksil radikali biyolojik moleküller için en reaktif oksijen ürünüdür. DNA'da baz hasarları ve DNA-protein çapraz bağları gibi bir çok hasar oluşturur (Dizdaroğlu M. 1992). Oksidatif DNA hasarı olarak da adlandırılan bu tip DNA hasarları mutajenez, karsinogenez ve yaşlanma gibi biyolojik olaylarda görev alır (Halliwell vd 1990).

Reaktif oksijen türleri eksojen ve endojen kaynaklı olabilir. Gama ışınları, UV ışınları, yiyecekler, ilaçlar, ksenobiyotikler ve toksinler eksojen ROT kaynaklarıdır. Nötrofiller, NO sentetaz ve ksantin oksidaz gibi enzimler, metabolizma ürünleri ve hastalıklar endojen ROT kaynaklarıdır (Kohen vd 2002). Serbest radikaller kendiliklerinden bozunarak ya da özelleşmiş enzim sistemleri tarafından uzaklaştırılır. Bunların aşırı üretilmesi veya yeterince uzaklaştırılmaması, hücrelerde birikimlere yol açarak lipid peroksidasyona, protein ve DNA hasarına yol açabilir (Kumar vd 2013).

2.5. *Crithmum maritimum* L.

C. maritimum, kaya koruğu veya deniz rezenesi olarak bilinen, deniz kenarındaki uçurumlarda ve bazen kumlarda yetişen bir bitkidir (Amor vd 2005). Yüksek ışık yoğunluğu, kuraklık, mineral eksikliği ve tuzlu ortam gibi çevresel strese rağmen Atlantik Okyanusu ve Akdeniz kıyı alanlarında yaygın olarak yetişir. Buralarda uzun yıllardır besin olarak tüketilmektedir ve halk tarafından alternatif tıpta kullanılmaktadır. Etli yaprakları ve genç dallarından turşu ve çeşni yapılmaktadır (Amor vd 2005, Ashraf vd 2004).

Tuzlu ortam gibi stres altında yetişen CM'nin, içeriğindeki yüksek antioksidan konsantrasyonu sayesinde reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu oksidatif hasara karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (Ashraf vd 2004, Ksouri vd 2007). Analiz edildiğinde stabil 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ve ABTS serbest radikallerini temizlediği için antioksidan aktivitesinin ve total antioksidan kapasitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Duros vd 2009). Bu uzun ömürlü bitki, yüksek oranda flavonoidler, karotenoidler, C vitamini ve antimikrobiyal madde içermektedir (Amor vd 2005). İçeriğindeki, fenolik bileşiklerden olan klorojenik asit sayesinde antioksidan özelliği fazladır (Heim vd 2002), serbest radikalleri temizler ve reaktif oksijen türlerine karşı koruyucudur (Balasundram vd 2006). Ayrıca CM'dan kök hücre elde edilebilir ve CM'nin kök hücrelerinin proliferatif potansiyeli biyoteknoloji ile amplifiye edilebilir. Bu kök hücrelerdeki antioksidanların varlığı nedeniyle rejenerasyon ve savunma kapasiteleri vardır (Lequeux vd 2011).

2.6. Hipotezler

Çalışmamız aşağıdaki hipotezleri test etmek amacıyla planlanmıştır:

1. Diş beyazlatıcı ajanlar sitotoksositeye neden olmakta ve bu süreçlerin sonunda DNA hasarı meydana gelebilir.
2. Meydana gelebilecek DNA hasarı artmış oksidan radikaller nedeniyle olabilir. Beyazlatma öncesi uygulanan antioksidanlar da bu oksidan radikallerin azaltılmasını sağlayarak DNA onarımını hızlandırabilir.
3. Meydana gelebilecek enflamatuar yanıt antioksidanlarla düzeltilebilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Hücre kültürü kullanılarak *in vitro* koşullarda yaptığımız çalışmada insan diş pulpası kök hücresi (DPSC) kullanılmıştır. Hücrelerimiz insan dişinin pulpasından elde edilen kök hücre olup yüzeye yapışan karakterde ve iğ şeklindedir (Şekil 3.1). Çalışmamız kapsamında DPSC hücrelerinin dondurulması, çözündürülmesi, hücre kültürü ortamında çoğaltılması ve pasajlanması, hücre canlılığının ve sitotoksitesinin belirlenmesi, deneyin kurulması ve hidrojen peroksit, E vitamini, *C. maritimumun* uçucu yağının uygulanması, DNA hasarının incelenmesi, TNF α , IL-6, total oksidan ve antioksidan seviyelere bakılması Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapılmıştır. Hücrelerin sayımı Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapılmıştır.

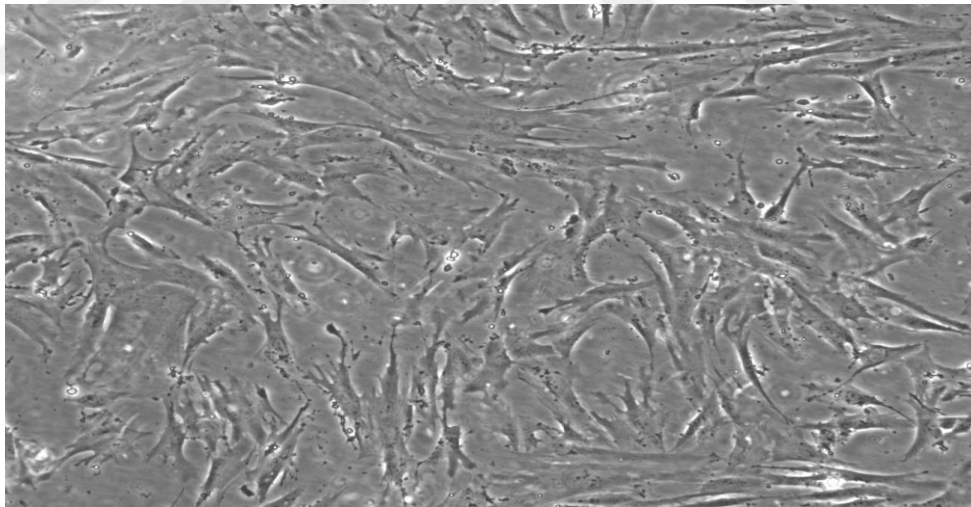
Çalışmamızda diş beyazlatıcı ajan olarak hidrojen peroksit uygulanmasının hücre kültürü yöntemleri kullanılarak *in vitro* koşullarda diş pulpası kök hücrelerinde (DPSC) DNA hasarı oluşturup oluşturmadığını ve ayrıca DNA hasarı oluşturuyorsa antioksidan olarak E vitamini ve *C. maritimum* bitkisinin uçucu yağının bu hasarı düzeltmede etkili olup olmadığını komet analiz yöntemiyle incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla aşağıdaki şekilde çalışma grupları oluşturulmuştur.

3.1. Deney Grupları

Hidrojen Peroksit, E vitamini ve *C. Maritimum* uçucu yağının, DPSC hücreleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla 4 gün sürecek bir deney düzeneği ve 7 farklı deney grubu oluşturuldu. Yapılan XTT analizine göre hidrojen peroksit için IC₅₀ dozu 6 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Ayrıca yapılan bir çalışmada hücre kültürü üzerine monte edilen dişlerin üzerine %35 konsantrasyonda HP içeren diş beyazlatıcı uygulandığında hücrelere sızan dozun yaklaşık 2 $\mu\text{g/ml}$ olduğu bildirilmiştir. Bu dozun da refrans olarak alındığı deney grubu da oluşturulmuştur (Soares vd 2014).

- 1. Grup:** Kontrol (K) grubudur. Bu gruptaki DPSC hücrelerine herhangi bir işlem yapılmadı.

2. **Grup:** 2 Hidrojen Peroksit (2HP) grubu. Bu gruptaki hücreler 2 µg/ml hidrojen peroksit 30 dakika maruz bırakıldı. Sonrasında ölçümler 0, 24, 48, 72. saatlerde yapıldı.
3. **Grup:** 6 Hidrojen Peroksit (6HP) grubu. Bu gruptaki hücreler 6 µg/ml hidrojen peroksit 30 dakika maruz bırakıldı. Sonrasında ölçümler 0, 24, 48, 72. saatlerde yapıldı.
4. **Grup:** E vitamini - 2 Hidrojen Peroksit (E2HP) grubu. Bu gruptaki hücreler önce 100 µM E vitamini 2 saat, sonrasında 2 µg/ml hidrojen peroksit 30 dakika maruz bırakıldı. Ölçümler 0, 24, 48, 72. saatlerde yapıldı.
5. **Grup:** E vitamini - 6 Hidrojen Peroksit (E6HP) grubu. Bu gruptaki hücreler önce 100 µM E vitamini 2 saat, sonrasında 6 µg/ml hidrojen peroksit 30 dakika maruz bırakıldı. Ölçümler 0, 24, 48, 72. saatlerde yapıldı.
6. **Grup:** *C. maritimum* - 2 Hidrojen Peroksit (CM2HP) grubu. Bu gruptaki hücreler önce 2 µg/ml *C. maritimum* uçucu yağına 1 saat, sonrasında 2 µg/ml hidrojen peroksit 30 dakika maruz bırakıldı. Ölçümler 0, 24, 48, 72. saatlerde yapıldı.
7. **Grup:** *C. maritimum* - 6 Hidrojen Peroksit (CM6HP) grubu. Bu gruptaki hücreler önce 2 µg/ml *C. maritimum* uçucu yağına 1 saat, sonrasında 6 µg/ml hidrojen peroksit 30 dakika maruz bırakıldı. Ölçümler 0, 24, 48, 72. saatlerde yapıldı.



Şekil 3.1 DPSC'nin mikroskopik görüntüsü

3.2. DPSC Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

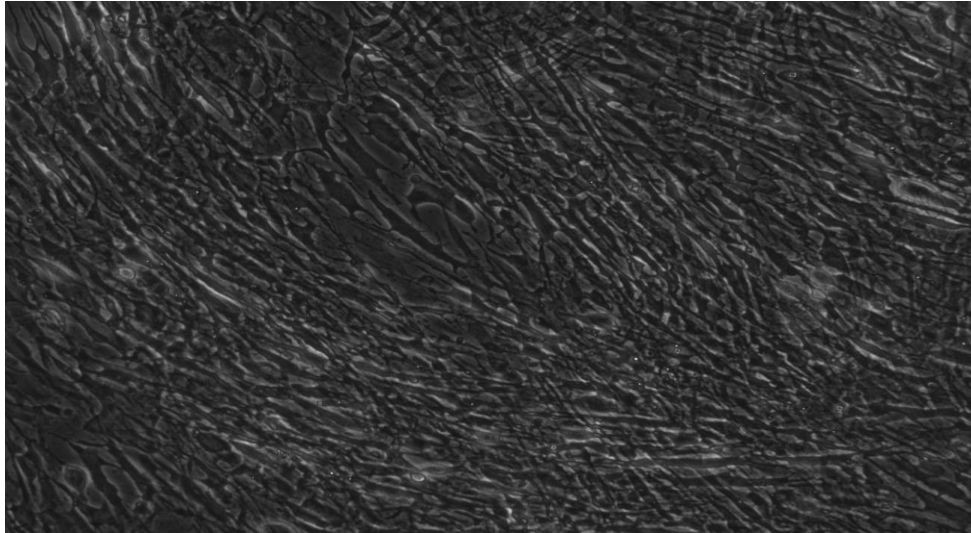
Çalışmamızda hücrelerin proliferasyonu, pasajlanmaları ve takip işlemleri inverted mikroskop ile izlendi. DPSC için %10 fetal sığır serum (FBS), %1 L-glutamin, 100IU/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin içeren Alfa MEM besi yeri hazırlandı. Alfa MEM besi yeri ile üretilen DPSC hücreleri 37 °C'de %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde çoğaltıldı. Her iki güne bir ortam değişimi yapıldı.

3. 2. 1. DPSC Hücrelerinin Dondurulması

1. Flasklarda bulunan hücreler tripsinizasyon işlemi ile yapışmış oldukları flask yüzeyinden kaldırılarak üzerlerine besi yeri ilave edildi.
2. Hücre süspansiyonu 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
3. Santrifüj tüpü sayısı kadar 1,5 ml'lik kriyo tüpler hazırlandı. Santrifüj sonrası süpernatant kısım uzaklaştırılarak üzerine besi yeri ilave edildi ve hücre süspansiyonu kriyo tüplere alındı.
4. Sonrasında üzerine besi yeri ve DMSO oranı 9:1 olacak şekilde DMSO eklendi. Kriyo tüpler dondurucu kap içinde 2 saat bekletildikten sonra -80°C ' ye kaldırıldı.

3. 2. 2. Dondurulmuş DPSC Hücrelerinin Çözdürülmesi

1. -80°C ' de kriyo tüpler içerisinde bulunan %10 DMSO ile dondurulmuş DPSC hücreleri çözünmesi için birkaç dakika 37°C ' de etüve kondu.
2. Hücre canlılığının DMSO nedeniyle azalmaması için kriyo tüp içerisine hızlı bir şekilde besi ortamı ilave edildi ve hücreler 15 ml'lik falkon tüp içerisine alındı.
3. Falkon tüp içerisine yaklaşık 5 ml daha besi yeri ilave edilerek 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
4. Sonrasında falcon tüpü içerisinde bulunan süpernatant uzaklaştırıldı ve çöken hücrelerin üzerine 10 ml besi yeri eklenerek 75 cm^2 lik flasklara alındı.
5. Flasklar, 37°C 'deki %95 nem ve %5 CO_2 içeren etüve alınarak inkübasyona bırakıldı. 48 saat sonra üremeye başlayan hücrelerin kullandıkları eski besi ortamı döküldü ve yerine 10 ml taze besi yeri ilave edildi. Yaklaşık 21 gün sonra hücrelerin bütün flask yüzeyini kapladığı görüldü (Şekil 3.2). Hücrelerin canlılığını korumak ve devamlılığını sağlamak amacıyla pasaj yapıldı.



Şekil 3.2 DPSC'nin 21 gün sonraki pasajlanma öncesi mikroskopik görüntüsü

3. 2. 3. DPSC Hücrelerinin Pasajlanması

1. Flasklardaki hücrelerin konfluenti %70'den fazla olduğunda pasajlama yapıldı (Şekil 3.2).
2. Flasklarda bulunan ortam döküldü ve flasklar bir kez PBS kullanılarak yıkandı.
3. Sonrasında hücrelerin üzerine 2 ml tripsin-EDTA ilave edildi. Flasklar 5 dakika boyunca inkübatörde bekletildi.
4. İnkübatörden çıkan flasklar hafif altlarından vurarak tüm hücrelerin kaldırılması sağlandı. Flaska 4 ml besi yeri ilave edildi.
5. Flask içerisinde bulunan hücre-ortam karışımı 15 ml'lik santrifüj tüp içerisine alındı ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifuj edildi.
6. Santrifuj sonrası santrifüj tüpü içerisinde bulunan süpernatant uzaklaştırıldı ve çöken hücrelerin üzerine 1 ml besi yeri eklendi ve birkaç kez pipetaj yapılarak hücrelerin homojen şekilde dağılması sağlandı.
7. 75 cm²'lik flasklara 10 ml ortam koyuldu ve içine homojen dağılmış olan hücreden konuldu.
8. Hücrelerin yüzeye yapışarak üremeye devam etmeleri için flasklar inkübatöre kaldırılarak inkübasyona bırakıldı ve çoğalmaları sağlandı.

3. 2. 4. DPSC Canlı Hücrelerinin Sayılması

Canlı hücrelerin sayılmasında tripan mavisi boyası uygulandı. Bu boya negatif yüklüdür. Hücre membranı zarar görmemiş ve canlı bir hücre ise, boya hücre içine

girmediği için canlı hücreler beyaz renkte görülür. Ancak canlı olmayan hücreler boyayı absorbe eder ve mikroskop altında mavi görünürler.

1. DPSC hücrelerine tripsinizasyon işlemi yapıldı. Tripsinizasyon işleminden sonra hücrelere besi ortamı eklenip flask içerisinde bulunan hücre-ortam karışımı 15 ml'lik santrifüj tüpü içerisine alındı ve 1500 rpm de 5 dakika santrifuj edildi.
2. Santrifüj sonrası, santrifüj tüpü içerisinde bulunan süpernatant uzaklaştırıldı ve çöken hücrelerin üzerine 1 ml besi ortamı eklendi ve birkaç kez pipetaj yapılarak hücrelerin homojen şekilde dağılması sağlandı.
3. Homojen süspansiyondan 100 µl alınıp steril ependorfa konuldu. Üzerine 400 µl PBS eklenip birkaç kez pipetaj yapılarak hücrelerin homojen şekilde dağılması sağlandı.
4. Üzerine 1 µl tripan mavisini konularak birkaç kez pipetaj yapıldı. Bu karışımdan 20 µl alınıp hücre sayar (Cellometer, Nexcelom USA) cihazında sayıldı.

3.3. Sitotoksosite Analizi

Sitotoksosite ölçmek için kullanılan metotlar, plazma membran permeabilitesindeki değişimler üzerine kurulmuştur. Bu yöntemlerde, hücreler irreversibl olarak hasara uğratılırken plazma membranını hasar görmeden kalır. Kolorimetrik metotlar, hücre kültürlerinde, herhangi bir faktöre bağılı olarak indüklenmiş sitotoksitenin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Biz bu amaçla XTT (2,3-Bis-(2-Metoksi-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazolyum-5-Karboksanilit tuzu) kolorimetrik metodu sitotoksosite ölçümü için kullanıldı. (WEB_4)

3.3.1. XTT Testi

İkinci jenerasyon suda çözünen bir tetrazolyum tuzu olan XTT, hücre proliferasyon, sitotoksosite ve apoptoz analizlerinde kullanılır. Yöntem, metabolik olarak aktif olan hücrelerin, renksiz veya açık sarı bir bileşik olan XTT'yi, parlak turuncu formazan bileşenlerine indirgemeleri prensibine dayanmaktadır. Renk değişimi pozitif yüklü dörtlü tetrazol halkasının kırılmasıyla elde edilir. XTT'nin hücrelere girmediği, trans-plazma membran sistemi aracılığıyla elektron taşınması sağlanarak XTT boya indirgenmesinin hücre yüzeyinde meydana geldiği gösterilmektedir. XTT'nin cevabının oluşumunda esas katkırı mitokondriyal oksidoredüktazların kendi redüktanlarının (indirgeyici) plazma zarına taşınmasıyla sağladığı düşünölmektedir. XTT canlı hücrede, mitokondriilerindeki dehidrogenaz enzimi ile parçalandığında çözülebilir formazana dönüşmektedir.

Ara elektron taşıyıcısı olan PMS (N-metil dibenzopirazin metil sulfat), XTT hücre proliferasyon analizi kiti içindeki aktivasyon reaktanı olup XTT analizinin hassasiyetini artırır. Bulgular göstermektedir ki PMS, hücre yüzeyindeki ya da plazma zarındaki elektronları toplayıp reaktif ara ürün oluşturarak XTT'nin indirgenmesine ve yüksek pigmentli formazanı oluşturmasına aracılık eder. Formazandan kaynaklanan turuncu rengin yoğunluğu metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılıdır (WEB_4).

3.3.2. Hidrojen peroksit, E vitamini ve CM uçucu yağının sitotoksitesinin belirlenmesi

Hidrojen peroksit, E vitamini ve *C. maritimum*'un uçucu yağının sitotoksitesi, "Cell Proliferation Kit"i kullanılarak XTT testi ile belirlendi.

XTT(2,3-Bis-(2-Metoksi-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazolyum-5-Karboksanilittuzu)ajanı:
 Reaktan A: cell proliferation kit (XTT, reagent solution A, Biological Industries) ve
 Reaktan B: cell proliferation kit (XTT activator solution B, Biological Industries) içerir.
 Reaktan A ile reaktan B, 50:1 oranında karıştırılarak XTT solüsyonu hazırlandı.

3.3.3. XTT Yöntemi

1. 75 cm²'lik flaslara ekilen ve flask yüzeyini kaplayan hücrelere tripsinizasyon işlemi uygulandı.
2. İşlem sonrasında hücreler üzerine 4 ml besi ortamı ilave edildi ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
3. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve hücreler üzerine 1 ml besi ortamı eklendi.
4. Hücre sayımı için bu karışımdan 100 µl alındı, üzerine 400 µl PBS ve 1 µl tripan mavisi konulup pipetaj yapıldı. Karışımdan 20 µl alınarak hücre sayım cihazında sayıldı.
5. Her kuyuda 25x10³ hücre olacak şekilde 100'er µl hücre süspansiyonu, 96 kuyulu plakalara dağıtıldı.
6. Hücrelerin yüzeye yapışması için 48 saat beklendi ve 48 saat sonunda 24, 48, 72 saat inkübasyon için ayrı ayrı hazırlanan 96 kuyulu plakaların kontrol kuyuları dışında tüm kuyularına aşağıda belirtilen dozlarda hidrojen peroksit, E vitamini ve CM uçucu yağı uygulandı.
7. Hidrojen peroksit, E vitamini ve *Crithmum maritimum*un uçucu yağının sitotoksitesini belirlemek amacıyla her biri için ayrı ayrı 96 kuyulu plaka ayrıldı. Hidrojen peroksit grubuna 100 µl içindeki son konsantrasyonları 0,5 - 1 - 1,5 - 2

- 3 - 4 - 5 - 6 - 8 - 10 µg/ml olacak dozda hidrojen peroksit uygulandı. E vitamini grubuna 100 µl içindeki son konsantrasyonları 0,1 - 0,2 - 0,5 - 1 - 2 - 3 - 5 mM olacak dozda E vitamini uygulandı. CM uçucu yağ grubuna 100 µl içindeki son konsantrasyonları 1 - 2 - 3 - 4 - 10 - 20 - 40 - 80 - 100 - 200 µg/ml olacak dozda CM uçucu yağı uygulandı.

8. Hidrojen peroksit, E vitamini ve CM uçucu yağı için 24 saat sonunda sadece 24 saatlik inkübasyona ayrılan kuyulardaki besi ortamı aspire edildi ve 100 µl taze besi ortamı ve (yukarıda oranları tarif edilen) XTT solüsyonundan 50 µl eklendi. XTT solüsyonu eklenmesinden yaklaşık olarak 4 saat sonra plakanın her bir kuyusunun absorbands değeri (OD) ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okundu. Hücre canlılığı yüzdesi her bir kuyuda ölçülen optik dansite değerinin kontrol kuyusundaki optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile hesaplandı.

Spesifik Absorbans = $A_{450nm}(\text{Test}) - A_{630nm}(\text{Test})$

$$\% \text{ hücre canlılığı} = \frac{\text{Ölçülen optik dansite değeri}}{\text{Kontrol optik dansite değeri}} \times 100$$

9. Aynı işlem, madde verilmesinden 48 ve 72 saat sonra da kalan plakalar için tekrarlandı.
10. Hidrojen peroksit, E vitamini ve CM uçucu yağının IC50 (half maximal inhibitory concentration) dozları ve inkübasyon süresi belirlendi. XTT testlerinin sonuçları kontrol gruplarıyla oranlanarak belirlendi.
11. Ordinat üzerinde (Y-ekseni) düzeltilmiş veri absorbands değerleri ve absis (x-ekseni) üzerinde deneysel parametreler (uygulanan dozlar) çizildi.
12. Sitotoksosite deneyleri triplike olarak yapıldı.

3.3.4. XTT İçin Deney Düzenineğinin Kurulması ve Hidrojen Peroksit, E vitamini ve *C. Maritimum* Uçucu Yağının Uygulanması

Hidrojen peroksit, E vitamini ve *C. maritimumun* uçucu yağının DPSC hücreleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla 6 gün sürecek bir deney düzenineği ve 4 farklı hücre grubu oluşturuldu:

1. **Grup:** Kontrol grubudur. Bu gruptaki DPSC hücrelerine herhangi bir muamele yapılmadı.

2. **Grup:** Hidrojen Peroksit grubu. Bu gruptaki hücrelere 0,5 - 1 - 1,5 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 8 - 10 µg/ml olacak dozda hidrojen peroksit uygulandı.
3. **Grup:** E vitamini grubu. Bu gruptaki hücrelere 0,1 - 0,2 - 0,5 - 1 - 2 - 3 - 5 mM E vitamini uygulandı.
4. **Grup:** *C. maritimum* uçucu yağ grubu. Bu gruptaki hücrelere 1 - 2 - 3 - 4 - 10 - 20 - 40 - 80 - 100 - 200 µg/ml olacak dozda CM uçucu yağı uygulandı.

Hidrojen peroksit, E vitamini ve *C. maritimumun* uçucu yağının DPSC hücreleri üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla sitotoksisite testi uygulandı. Her bir test için farklı 96 kuyulu plakalar kullanıldı.

3.4. *Crithmum Maritimum* Uçucu Yağının Eldesi

Çalışmamızda kullanılan *Crithmum maritimum L* uçucu yağı Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Labaratuvarında elde edilmiştir. *C. maritimum*, Apiaceae (Maydonozgiller) familyası içerisinde yer almaktadır, halk arasında kaya koruğu veya deniz rezenesi olarak bilinmektedir.

Bitki örnekleri çiçeklenme evresi olan Ağustos-Eylül ayında toplanmıştır. Toplanan bitkilerin toprak üstü kısımları bağ makası ile küçük parçalar haline getirilerek doğrudan güneş almayan serin bir yerde kurutulmuştur. Kurutulan bitkiler, ekstraksiyon elde etmeye hazır hale getirilerek bez torbalar içinde direkt güneş ışığı almayan serin bir ortamda muhafaza edilmiştir. Bitkiden clevenger ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakt elde edilmiştir. Bitkinin uçucu yağını elde etmek için clevenger ekstraksiyon düzeneği ile hidrodistilasyon yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen uçucu yağın içinde kalan bir miktar su sodyum sülfat tuzu ile uzaklaştırılmıştır.

Bu yöntemle elde edilen CM'nin uçucu yağı, hücre kültüründe diş pulpası kök hücrelerine, çeşitli dozlarda uygulanmış ve XTT analizi yapılarak IC₅₀ dozu 2 µg/ml olarak tesbit edilmiştir. Deney gruplarına 2 µg/ml CM'nin uçucu yağı 1 saat boyunca uygulanmış ve uzaklaştırılmış, sonrasında diş beyazlatıcı olarak HP 30 dakika boyunca uygulanıp ortamdaki uzaklaştırılmıştır.

3. 5. TAS, TOS, TNF Alfa ve IL-6 İçin Deney Düzenekinin Kurulması ve Hidrojen Peroksit, E vitamini ve *Crithmum Maritimum* Uçucu Yağının Uygulanması

Yukarıda tanımlanan deney gruplarına belirtilen sürelerde belirtilen dozlarda hidrojen peroksit, E vitamini ve *Crithmum Maritimum* uçucu yağı uygulanmıştır.

1. Hücreler 75'lik flaklara 2x10⁶ hücre olacak şekilde ekildi.

2. Yukarıdaki deney gruplarına belirtilen dozlarda hidrojen peroksit, E vitamini ve Crithmum Maritimum uçucu yağı eklendi ve belirtilen sürelerde inkübe edildi.
3. Flasklardaki DPSC hücreleri, 5 ml (Ca ve Mg free) PBS ile yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı.
4. Flasklardaki hücrelerin üzerine, Halt Proteaz Inhibitor eklenmiş, +4 °C olan RIPA solüsyonu eklendi ve teflon kazıyıcı ile hücreler kaldırıldı ve patlatıldı.
5. Oluşan süspansiyon steril ependorflara alındı. Burada insülin enjektörü ile birkaç kez pipetajlandı. 30 dakika buzun içinde bekletildi ve bu süre içinde 10 dakikada bir insülin enjektörü ile pipetajlandı.
6. Hücrelerin parçalanması sağlandıktan sonra +4 °C de 15000 rpm de 30 dk santrifüj edildi.
7. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant alınarak TAS, TOS, TNF Alfa ve IL-6 ölçümü için kullanıldı.

3.6. Total Oksidan Seviye (TOS) Ölçümü

Ölçümün prensibi, örneğin içindeki oksidanların, ferröz iyon şelatör kompleksini ferrik iyonla dönüşümü sağlaması ve bunun da asidik bir ortamda kromojen ile reaksiyona girerek absorban artışına sebep olmasına dayanmaktadır. Spektrofotometrik olarak izlenen absorban artışı örnekteki oksidan moleküllerle doğru orantılıdır (WEB_3).

Çalışmamızda, hidrojen peroksit, E vitamini ve Crithmum Maritimum uçucu yağının uygulanması ile deney gruplarında oluşan total oksidan seviyesi ticari bir kit aracılığıyla incelendi. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./ L}$ cinsinden ifade edildi.

1. TAS, TOS için hazırlanan, hücre kültüründen elde edilen örnekler kullanıldı.
2. TOS ölçümü, Rel Assay Diagnostics® Total Oxidant Status (TOS) Assay Kit (mega Tıp) kullanılarak yapıldı.
3. 96 kuyulu plakaya her kuyuda 200 μL olacak şekilde kit içindeki reaktan 1'den koyuldu.
4. Üzerine, ilk iki kuyuya standart solüsyonundan, diğer kuyulara numunelerden 30 μL koyuldu ve ELİSA okuyucu ile 492 nm dalga boyunda okundu. Elde edilen değerler 1. absorban ölçümü olarak kaydedildi.
5. Her bir kuyunun üzerine 10 μL reaktan 2 den koyularak 5 dk beklendi ve ELİSA okuyucu ile 492 nm dalga boyunda okundu ve elde edilen değerler 2. absorban ölçümü olarak kaydedildi.

6. TOS değeri, her bir kuyuda ölçülen örneklerin Δ absorbans optik dansite değerinin standartın Δ absorbans optik dansidite değerine bölünmesi ve 20 ile çarpılması ile hesaplandı.

$$\text{TOS Değeri} = \frac{\Delta \text{ absorbans örnek}}{\Delta \text{ absorbans standart}} \times 20$$

Δ absorbans örnek = Örneğin 2. Absorbans değeri – örneğin 1. Absorbans değeri

Δ absorbans standart = Standartın 2. Absorbans değeri – standartın 1. Absorbans değeri

7. Sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

3.7. Total Antioksidan Seviye (TAS) Ölçümü

Ölçümün prensibi, örneğin içindeki tüm antioksidanların mavi-yeşil ABTS radikalini renksiz redükte ABTS haline getirmesi esasına dayanır. Örneğin absorbansındaki değişiklik onun antioksidan düzeyi ile orantılıdır (WEB_3).

Çalışmamızda, hidrojen peroksit, E vitamini ve Crithmum Maritimum uçucu yağının uygulanması ile deney gruplarında oluşan total antioksidan seviyesi ticari bir kit aracılığıyla incelendi. Sonuçlar mmolTrolox Equiv/ L olarak ifade edildi.

1. TAS, TOS için hazırlanan hücre kültüründen elde edilen örnekler kullanıldı.
2. TAS ölçümü, Rel Assay Diagnostics® Total Antioxidant Status (TAS) Assay Kit (mega Tıp) kullanılarak yapıldı.
3. Standart solüsyonu hazırlandı. Standart 1 için distile su, standart 2 için kit içinde bulunan standart 2 solüsyonu kullanıldı.
4. 96 kuyulu plaka her kuyuda 200 μ L olacak şekilde kit içindeki reaktan 1'den koyuldu.
5. Üzerine ilk iki kuyuya hazırlanan standart 1 solüsyonundan, sonraki iki kuyuya standart 2 solüsyonundan, diğer kuyulara numunelerden her numune için 2 kuyu olacak şekilde 12 μ L koyuldu ve ELİSA okuyucu ile 630 nm dalga boyunda okundu. Elde edilen değerler 1. absorbans ölçümü olarak kaydedildi.

6. Her bir kuyunun üzerine 30 µL reaktan 2 den koyularak 10 dk beklendi ve ELİSA okuyucu ile 630 nm dalga boyunda okundu ve elde edilen değerler 2. absorbans ölçümü olarak kaydedildi.
7. TAS değeri standart 1 Δ absorbans optik dansite değerinden her bir kuyuda ölçülen örneklerin Δ absorbans optik dansite değerinin çıkarılması ve bu değer in standart1-standart2 Δ absorbans optik dansite değerine bölünmesi ile hesaplandı.

$$\text{TAS Değeri} = \frac{[(\Delta \text{ abs std1}) - (\Delta \text{ abs örnek})]}{[(\Delta \text{ abs std1}) - (\Delta \text{ abs std 2})]}$$

Δ absorbans örnek = Örneğin 2. Absorbans değeri – örneğin 1. Absorbans değeri

Δ absorbans standart 1 = Std1'in 2. Absorbans değeri – Std1'in 1. Absorbans değeri

Δ absorbans standart 2= Std2'nin 2. Absorbans değeri – Std2'nin 1. Absorbans değeri

8. Sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

3.8. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Oksidatif stres indeksi, oksidatif stres derecesinin bir göstergesidir ve total oksidan seviyenin total antioksidan seviyeye bölünmesinin 100 ile çarpılması ile elde edilir.

$$\text{OSİ} = \frac{\text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equivalent/L})}{\text{TAS } (\mu\text{mol Trolox equivalent/L})} \times 100$$

3.9. Komet Yöntemi ile Genotoksisite Analizi

Genotoksisite, Deoksiribonükleik Asit (DNA)'da yapısal değişiklikler meydana getirerek ya da DNA sarmalında kırılmalara yol açan, hasara neden olan her türlü ajan için kullanılabilen bir terimdir (Kent C 1998).

Çok çeşitli genotoksisite analizleri vardır. Burada olası DNA hasarı tespitinde komet analiz yöntemi kullanıldı. Burlinson (2007), Al-Salmani (2011) ve arkadaşlarına göre yöntem, basit, düşük maliyetli ve uygulaması 24 saatten daha az zaman alması nedeniyle tercih edilmektedir (Araldi vd 2015).

3.9.1. Komet Analizi ve Tarihçesi

Komet analizi (KA), ilk kez Östling ve Johanson (1984) tarafından tek hücre jel elektroforezi veya mikrojel elektroforezi olarak adlandırılmış, yöntemin temelleri oluşturulmuş, devamında çeşitli araştırmacılar tarafından günümüze kadar modifiye edilmiş ve yeni teknikler ile birlikte sunulmuştur (Hartmann vd 2003). Günümüzde uygulanan KA, Singh ve arkadaşları (1988) tarafından geliştirilmiş olan, tek ve çift zincir kırıklarının tanımlanmasına olanak sağlayan bir yöntemdir. KA, 'Genotoksisitede test prosedürleri uluslararası çalıştay' (Hartmann vd 2003) ve 'Genotoksisite testleri uluslararası 4. Çalıştay'ında (Burlinson vd 2007) standardize edildi.

KA, yeni ilaçların uygunluğunun belirlenmesinde ilaç endüstrisi tarafından kabul edilen yöntemlerden biri olmuştur (Brambilla vd 2009).

DNA sarmalındaki kırıklar elektroforezde yürütülürken migrasyona uğradığı için kuyruklu yıldız görünümü oluşur. Bu yüzden yöntemin adı İngilizcede kuyruklu yıldız anlamına gelen 'comet' tir (Godschalk vd 2013).

KA, test edilen madde ile doğrudan temas halinde olan dokularda genotoksisiteyi analiz etmeyi sağlar veya emilim, dağılım, metabolizasyon veya atılım olan dokularda (in situ olarak) DNA kırıklarını belirler (Hartmann vd 2003). Tekniğin floresan in situ hibridizasyon (FISH) ile ilişkilendirilerek uygulanması DNA hasarı tespitinde yeni yaklaşımlar geliştirebilir (Spivak vd 2015).

3.9.2. Komet Analizinde Boyama

Bu yöntemde (floresan mikroskopta görüntü sağlayabilecek) çok çeşitli boyalar kullanılmaktadır. Gümüş boya (Nadin vd 2001), etidyum bromür (EB) (Araldi vd 2014), propidyum iyodür (Araldi vd 2013), DAPI (40,6-diamidino-2-phenylindole), YOYO-1 (Rojas vd 1999) and SYBR Gold (McNamee vd 2000) komet yönteminde kullanılabilen boyalardır. DAPI ve YOYO-1, DNA hasarını çok hassas olarak tesbit etseler de en çok EB ve PI kullanılmaktadır (Klaude vd 1996). DNA, kendisine bağlanan bir boya ile boyandıktan sonra floresan mikroskop ile görüntülenir (Araldi vd 2015).

Mikroskopta DNA süper halkalarını görüntüleyebilmek için etidyum bromür ile boyanan lamlar yoğun yeşil ışık ile aydınlatılır. Işık kaynağından UV dahil diğer dalga boylarını elimine etmek için filtre kullanılır ve filtreden sadece yeşil ışık geçebilir. Etidyum bromür zayıf turuncu renk ışımaya yapar (emisyon) gün ışığında gözlenmez bu yüzden karanlık odada çalışılmalıdır (WEB_5).

3.9.3. Görüntü Analizi

Didenko VV. (2006) ve Fidan AF'ye göre (2009) hasarsız DNA'lar, yuvarlak, kenarları daha az yoğun olmak üzere ortası parlak görüntülenirler. Hücrelerin bu görünümü migrasyon yok diye değerlendirilir. Eğer DNA hasarı oluşmaya başlamış ise migrasyon uzunluğu fragmanların miktarına, DNA zincir kırılmalarına ve alkali-labil bölgelerin seviyelerine bağlı olarak değişiklik gösterdiğinden, normalde düzgün kenarlı olan görüntü, DNA kırıklarının çekirdek dışına göçü nedeniyle düzensiz kenarlı bir görünüm alır. Hasarın şiddetine göre merkezden kenara doğru uzama olur. Bu görünüme uzama ya da düşük migrasyon denir. Hasar arttıkça hücreler kuyruklu yıldız şeklini alır ve yüksek migrasyon olarak değerlendirilir. Bu uzama hasar ile doğru orantılıdır. Ayrıca kuyruktaki floresan yoğunluğu da hasarın derecesine paraleldir. (Gündoğdu 2012).

Komet analizi, hem bilgisayar hem de görsel tabanlı bir analizdir.

- a) **Görsel Analiz:** Görsel analize göre DNA süper halkası (kometler) DNA göç uzunluğuna göre 5 kategoride değerlendirilir. Sayma işlemi için her lamdan rastgele 100 DNA süper halkası (komet) seçilir ve her birine içinde buldukları kategoriye göre bir değer verilir (0, 1, 2, 3 veya 4). Her bir kategorideki DNA süper halkası (komet) sayısı belirlenerek özel formüller ile DNA hasarı belirlenir (Green vd 1996).
- b) **Bilgisayarlı Görüntü Analizi:** Komet yönteminde preparat incelenirken görüntü analizi yapılabilmesi için floresan parametrelerini hesaplayacak çok sayıda yazılım bulunmaktadır. Mikroskop üzerine monte edilen kapalı sistem dijital kamera bağlantısı ile otomatik olarak DNA süper halkalarının (kometlerin) görüntüleri değerlendirilir. Programlar comet başını kuyruktan ayırt edebilecek ve kuyruk uzunluğu, baş ve kuyruktaki floresans yüzdesi, kuyruk momenti gibi çeşitli değişkenleri belirleyebilecek şekilde yapılmıştır (Green vd 1996).

Didenko'ya göre (2006) DNA parçaları, baş ve kuyruk olarak iki ana bölüme ayrılmakta, baş ve kuyruk uzunluğu [BU ve KU, μm] ve baş ve kuyruk kısmındaki rölatif floresan yoğunluğu [baş ve kuyruk kısmındaki DNA yüzdesi sırası ile, % B-DNA ve % K-DNA olarak ifade edilir], kuyruk momenti [KM, μm olarak ifade edilir, % K-DNA ile KU'nun çarpımının 100'e bölünmesi ile edilen bir değerdir] ve kuyruk migrasyonu [baş kısmının kenarından küçük saptanabilir fragmana DNA göçünün uzunluğu] kullanılan parametreler arasındadır. Yapılan çalışmalarda, baş ve kuyruk uzunluğunun çok fazla anlamlı olmadığı ortaya çıkmıştır. Sadece kuyruklar ilk oluşmaya başladığı ve genellikle de düşük hasar seviyesini gösteren dönemde artmaktadır. Hasar miktarı arttıkça kuyruk, yoğunluk bakımından artmaktadır. Rölatif kuyruk yoğunluğu en kullanışlı

parametredir; kırılma frekansı ile doğru bir orantı göstermektedir. Arka zemin ayarlarından etkilenmez ve en geniş aralıkta DNA hasarının fark edilmesine olanak tanır.

3.9.4. Komet Analizinde Preparat Değerlendirilmesi

Didenko'ya göre (2006) DNA süper halkası (komet) rasgele seçilmeli ve tüm jeli temsil etmelidir. Jel sistematik bir şekilde taranmalıdır. Kenar bölgeler, hava kabarcıklarının kenarları ihmal edilmelidir. Bu bölgelerde genellikle anormal hasar görülür. Üst üste binen DNA süper halkalarının analizi, bilgisayar analiz yöntemlerinin kullanımıyla mümkün değildir. Ancak, üst üste binen DNA süper halkalarının kuyrukları oldukça uzundur. Eğer çok fazla sayıda üst üste binen DNA süper halkaları göz ardı edilirse, hasar görmemiş az kuyruklu DNA süper halkalarına önemli derecede eğilim oluşabilir. Bu durumda, jel hazırlanırken hücre yoğunluğunun iyi ayarlanması gerekmektedir.

3.9.5. Komet Analizi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)

Solüsyon, histon serbestlenmesini ve DNA'nın açılmasını sağlar. Elektroforezde DNA kırıkları anoda doğru hareket ederler ve kometin kuyruklu yıldızını meydana getirirler. Elektroforezden sonra lamlar nötralizasyon solüsyonunda 5 dk bekletilir. Bu işlem 3 kez tekrar edilir ve lamlar boyanır. Lamlar optik mikroskop ya da floresan mikroskopta değerlendirilir (Azqueta vd 2013, Rojas vd 1999). Görüntünün otomatik yöntem ile değerlendirilmesi yoğunluk parametrelerine dayanır. Nükleotidlerin geometrik özelliklerine ve yaydıkları floresan yoğunluğa göre baş uzunluğu, kuyruk uzunluğu, baş yoğunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti, kuyruk migrasyonu değerlerini, bilgisayar yazılımında otomatik olarak belirler (McKelvey vd 1993).

Eğer DNA kırıkları oluşmuşsa, görüntüde elektroforetik alanda anoda doğru göç etmiş olarak bulunurlar. Oluşan komet yapısının anoda doğru göç eden kuyruk bölümünde DNA kırıkları bulunurken baş kısmında ise hasar oluşmamış DNA yer alır (Araldi vd 2015).

3.9.6. Komet Analizi Yöntemi

1. Hücreler 75'lik flasklara 2×10^6 hücre olacak şekilde ekildi.

2. Yukarıda tarif edilen deney gruplarına belirtilen dozlarda hidrojen peroksit, E vitamini ve Crithmum Maritimum uçucu yağı eklendi ve belirtilen sürelerde inkübe edildi.
3. Flasklardaki DPSC hücreleri, 5 ml kalsiyum ve magnezyum içermeyen PBS (fosfat tampon tuzu) ile yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı.
4. Flasklardaki hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırıldıktan sonra hücreler üzerine 4 ml besi ortamı ilave edildi, 15'lik falcon tüpe alınıp 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve hücreler üzerine 150 µl PBS eklendi.
5. Oluşan süspansiyondan 20 µl alınıp kalsiyum ve PBS ile 37 °C'de hazırlanan %0,5'lik, 60 µl düşük erime noktalı agaroz (DNA) jel ile resüspanse edildi.
6. 80 µl olan süspansiyon, bir gün önceden %0,75'lik normal erime noktalı agaroz (DNA) jel ile kaplanmış olan lam üzerine ince bir tabaka halinde döküldü ve homojen dağılması için üzerine lamel kapatıldı.
7. Preparat +4 °C'de 20 dakika bekledikten sonra lamel kaldırılıp lamın üzeri 3. tabakayı oluşturan 75 µl %0,5'lik düşük erime noktalı agaroz (DNA) jel ile kaplandı ve üzerine lamel kapatılıp tekrar +4 °C'de 20 dakika beklendi. Sonrasında lamel kaldırılıp lam hücrel proteinleri uzaklaştırmak amacıyla, membranları kaldıran hücrel sürfaktanlardan Triton X-100 içeren, pH'ı 10 olan soğuk lizis tamponu ile 120 dakika boyunca +4 °C'de muamele edildi. Lizis işleminden sonra lamlar distile sudan geçirildi.
8. Sonrasında lamlar yatay elektroforeze aktarıldı ve histon serbestlenmesini ve DNA'nın açılmasını sağlayan 10 N sodyum hidroksit, 200 mM EDTA ve distile su ile hazırlanmış pH 13 olan alkalın elektroforez solüsyonunda, karanlıkta 30 dakika süre ile inkübe edildi.
9. Elektroforez işlemi DNA hasarı olmaması için +4 °C'de, 300 mA ve 20 V'da 30 dakika boyunca devam etti. Elektroforezde DNA kırıkları anoda doğru hareket ederler ve kometin kuyruklu yıldızını meydana getirirler. Eğer DNA kırıkları oluşmuşsa, görüntüde elektroforetik alanda anoda doğru göç etmiş olarak bulunurlar. Oluşan komet yapısının anoda doğru göç eden kuyruk bölümünde DNA kırıkları bulunurken baş kısmında ise hasar oluşmamış DNA yer alır.
10. Elektroforez işlemi takiben, lamlar, 0.4 M Tris ve distile su ile hazırlanan pH 7.5 olan nötralizasyon solüsyonunda, alkalın ve deterjanları uzaklaştırmak amacıyla 3 kez 5 dakika +4 °C'de yıkandı.
11. Daha sonra lamlar 60 µl etidyum bromür (2 µl/ml) ile boyanarak floresan mikroskopunda incelendi. "Comet assay IV system (AutoComet)" programıyla DNA hasarı değerlendirildi.

Görüntünün otomatik yöntem ile değerlendirilmesi yoğunluk parametrelerine dayanır. Nükleotidlerin geometrik özelliklerine ve yaydıkları floresan yoğunluğa göre baş uzunluğu, kuyruk uzunluğu, baş yoğunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti, kuyruk migrasyonu değerlerini, bilgisayar yazılımında otomatik olarak belirler (Araldi vd 2015).

3.10. İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 21.0 paket programıyla analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama±standart hata (SH) olarak verilmiştir. Ölçümler arasındaki bağımsız grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis Varyans Analizi ve takiben Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Genotoksisitenin Belirlenmesi

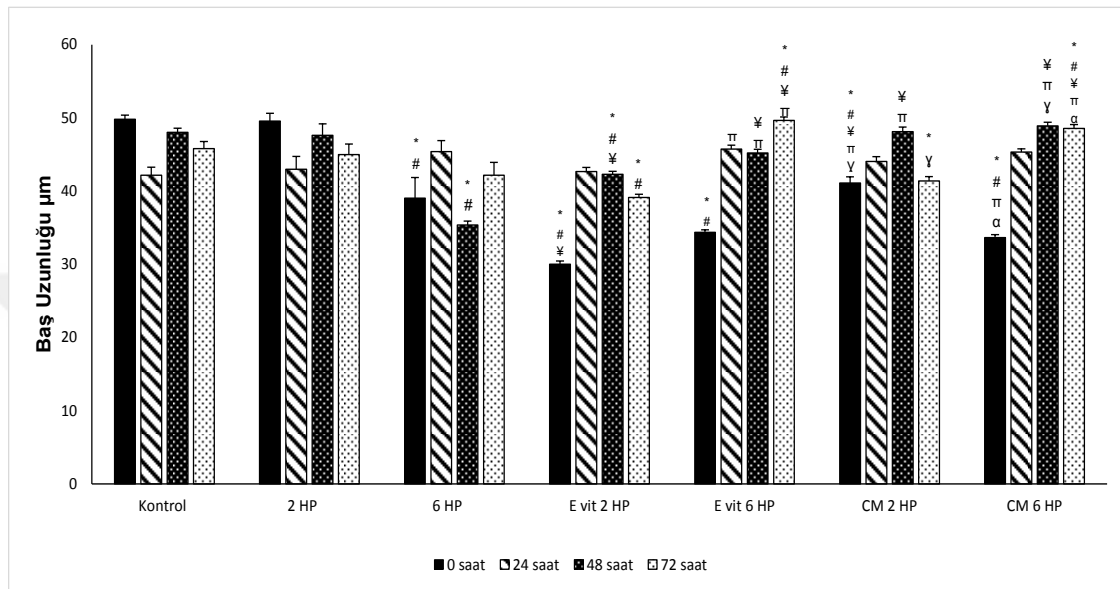
4.1.1. Baş Uzunluğunun Belirlenmesi

Baş uzunluğunun sıfırinci saatteki ortalamaları Tablo 4.1 de gösterilmiştir. Sıfırinci saatteki gruplar karşılaştırıldığında, baş uzunluğunda, 2HP grubu hariç diğer gruplarda kontrole göre anlamlı azalma görüldü ($p=0.000$). Kontrol ile 2HP grubunun baş uzunluğu ortalamaları yakın değerlerde olup aralarında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$). Baş uzunluğunun 24. saatteki ortalamaları Tablo 4.2 de gösterilmiştir. Baş uzunluğunda 24. saatte tüm gruplar arasında anlamlılık varken ($p=0.007$); ikili karşılaştırmalarda kontrol grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Sadece E6HP grubunun ortalamasının E2HP grubuna göre anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ($p=0.003$). Kırk sekizinci saatteki baş uzunluğu ortalamaları Tablo 4.3 de gösterilmiştir. Kırk sekizinci saatteki gruplar karşılaştırıldığında, 6HP ve E2HP baş uzunluğu ortalamalarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir ($p=0.000$). Yetmiş ikinci saatteki baş uzunluğu ortalamaları Tablo 4.4 de gösterilmiştir. Yetmiş ikinci saatteki gruplar karşılaştırıldığında, 2HP ve 6HP hariç diğer tüm grupların baş uzunluğu ortalamaları kontrole göre anlamlı farklılık gösterdi ($p<0.05$). Sadece E6HP ve CM6HP'nin ortalamaları artarken diğer grupların ortalamaları azalmıştır, Şekil 4.1.

Ayrıca tüm grupların kendi içlerinde 0, 24, 48 ve 72. saatlerdeki ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olup olmadığı değerlendirilmiştir. Kontrol grubunun 0. saatteki baş uzunluğu ortalaması en yüksek, 48. saatteki ölçüm 0. Saatteki ölçüme yakın değerdedir, aralarında anlamlı farklılık yoktur. 24. ve 72. saatlerdeki ölçümler, 0. ve 48. saattekilerden düşük olup 24 saat sonraki ölçüm 0. ve 48. saatteki ortalamalardan, 72. saatteki ölçüm de 0. saatteki ölçümden anlamlı olarak azalmıştır ($p=0.000$), Şekil 4.2.

2HP grubu kendi içinde değerlendirildiğinde 0. saatteki baş uzunluğu ortalamasına göre 24. ve 72. saatlerdeki ölçümler anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer saatler arasında anlamlı fark gözlenmemiştir, Şekil 4.4.

Baş uzunluğu, 6HP grubu içinde değerlendirildiğinde 0. saat ile 24. ve 72. saat ve 48. saat ile 24. ve 72. saatteki değerler arasında anlamlı fark görülmüştür ($p<0.05$), Şekil 4.6.

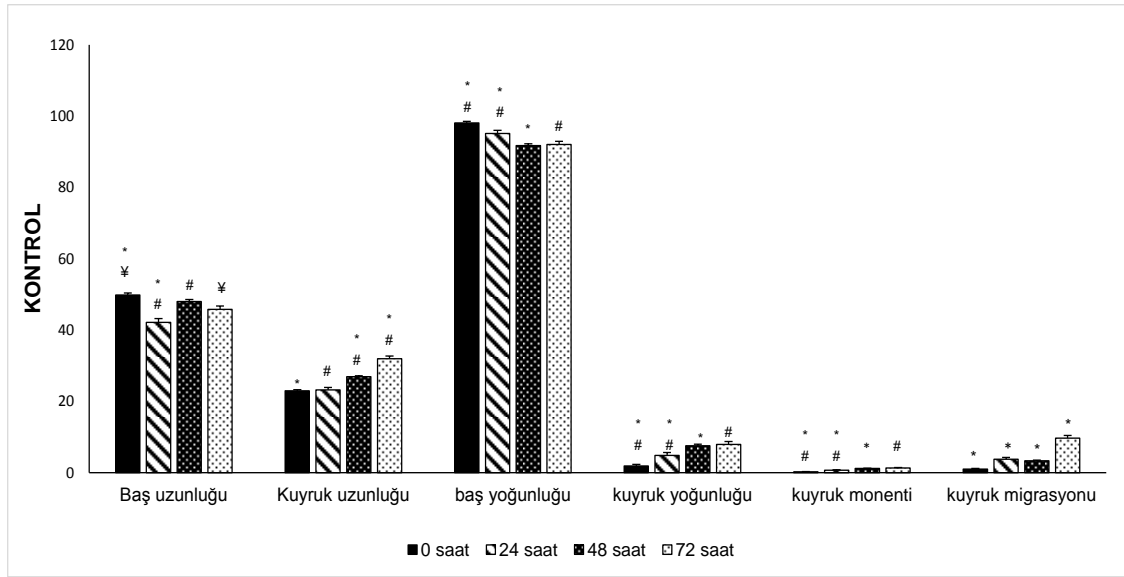


Şekil 4.1 Gruplar arasında baş uzunluğunun değerlendirilmesi

- * ; kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p<0.05$
- # ; 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p<0.05$
- ¥ ; 6 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p<0.05$
- π ; E 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p<0.05$
- γ ; E 6 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p<0.05$
- α ; CM 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p<0.05$

E vitamini uygulanan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde en düşük baş uzunluğu ortalaması 0. saatte ölçülmüş, 24. ve 48. saatteki ortalamalardan anlamlı olarak düşük bulunmuştur. E2HP grubunun 72. saat ortalaması 24 ve 48. saattekinden anlamlı olarak düşüken (Şekil 4.8) tam tersine E6HP grubunun ortalaması anlamlı olarak fazladır (Şekil 4.10). E vitamini uygulanan tüm gruplarda sadece 24. ve 48. saat ölçümlerinde anlamlı farklılık olmayıp diğer zamanlar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).

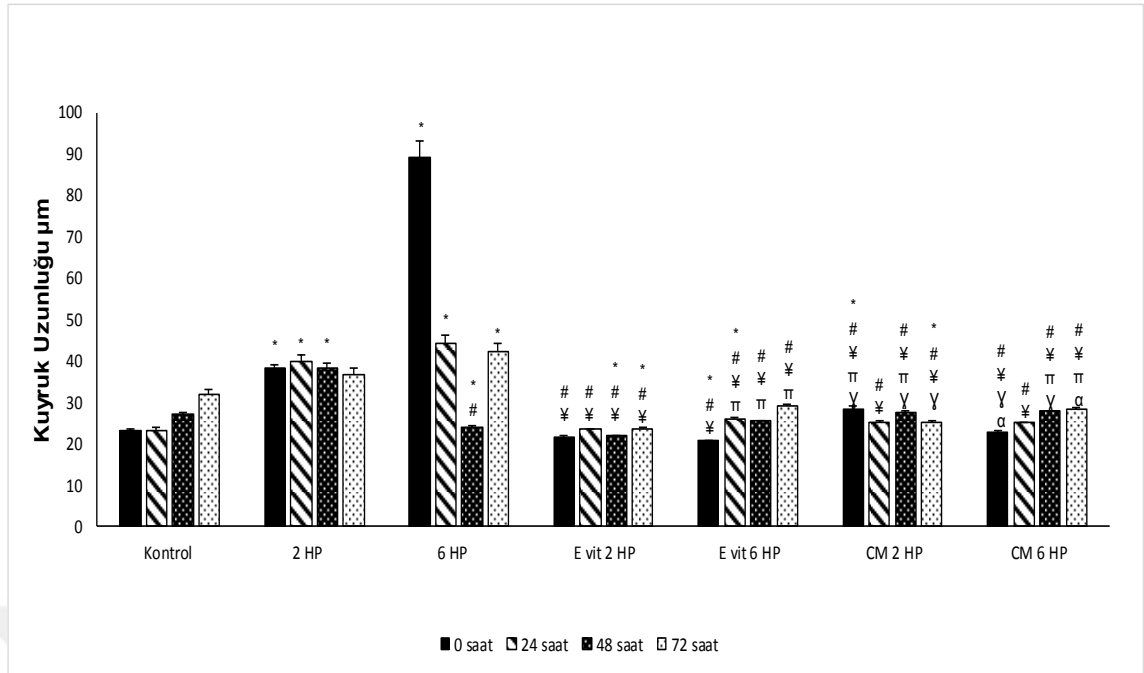
CM uygulanan gruplarda baş uzunluğu ortalamaları 0, 24, 48. saatlerde zamanla istatistiksel olarak artmakla beraber ($p<0.05$) CM6HP'nin 72. saatteki ile 48. saatteki ortalamaları arasında, CM2HP'nin 72. saatteki ile 0. saatteki ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur, Şekil 4.11, Şekil 4.13.



Şekil 4.2 Kontrol grubunun tüm parametrelerinin grup içi değerlendirilmesi
Kümelenmiş sütunlarda aynı işaretin taşınması anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$.

4.1.2. Kuyruk Uzunluğunun Belirlenmesi

Kuyruk uzunluğunun sıfırinci saatteki ortalamaları Tablo 4.1 de gösterilmiştir. Sıfırinci saatteki gruplar karşılaştırıldığında, kuyruk uzunluğunda, E2HP ve CM6HP grupları hariç diğer gruplarda kontrole göre anlamlı farklılık görülmüştür ($p < 0.05$). Kontrol grubuna göre 2HP, 6HP, CM2HP ortalamaları artarken E2HP, E6HP ve CM6HP ortalamaları azalmıştır. Yirmi dördüncü saatteki ortalamaları Tablo 4.2 de gösterilmiştir. Yirmi dördüncü saatteki gruplar karşılaştırıldığında, kuyruk uzunluğundaki artış 2HP, 6HP, E6HP gruplarında kontrole göre anlamlı iken ($p < 0.05$); E2HP, CM2HP, CM6HP gruplarındaki artış kontrole göre anlamlı değildi. Kırk sekizinci saatteki ortalamaları Tablo 4.3 de gösterilmiştir. Kırk sekizinci saatte grupların kuyruk uzunlukları ortalamaları karşılaştırıldığında 2HP, 6HP, E2HP gruplarında kontrole göre anlamlı farklılık varken ($p = 0.000$); E6HP, CM2HP, CM6HP gruplarında yoktu. Kontrole göre 2HP, CM2HP ve CM6HP ortalamaları artarken; 6HP, E2HP ve E6HP ortalamaları azalmıştır. Yetmiş ikinci saatteki gruplar karşılaştırıldığında, kuyruk uzunluğunda 6HP, E2HP, CM2HP gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık varken ($p = 0.000$); 2HP, E6HP, CM6HP gruplarında anlamlı farklılık yoktu. Kontrole göre 2HP ve 6HP ortalamaları artarken; E2HP, E6HP, CM2HP ve CM6HP ortalamaları azalmaktadır, Şekil 4.3.



Şekil 4.3 Gruplar arasında kuyruk uzunluğunun değerlendirilmesi

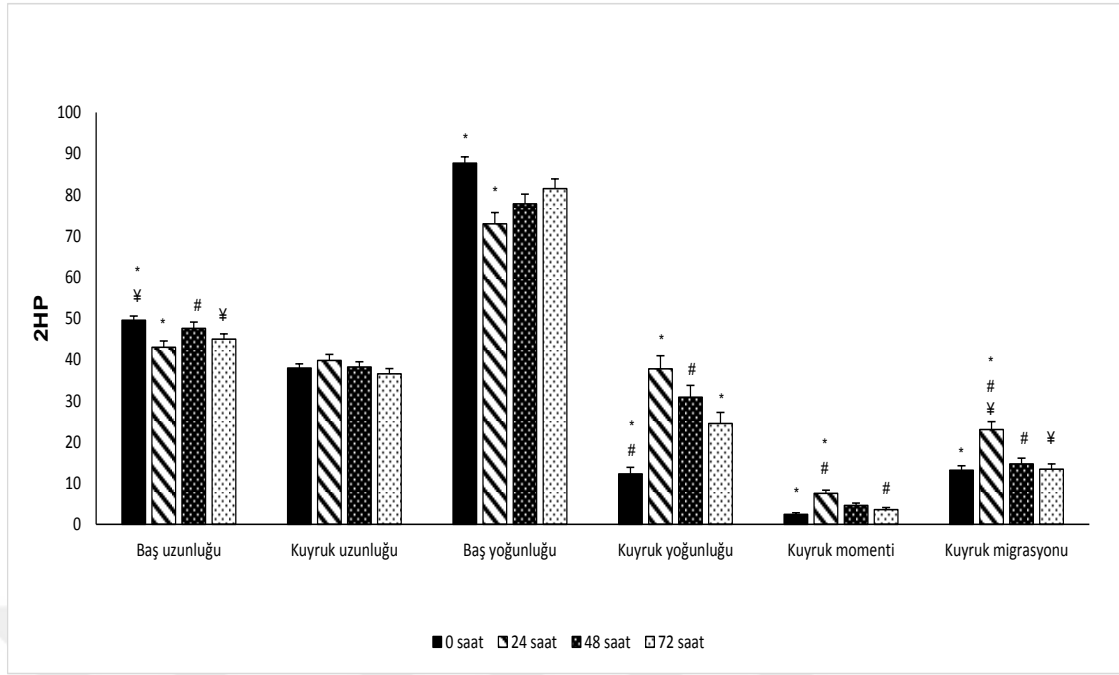
- * ; kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$
- # ; 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$
- ¥ ; 6 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$
- π ; E 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$
- Υ ; E 6 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$
- α ; CM 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$

Kontrol grubunun kendi içinde 0, 24, 48 ve 72 saatteki kuyruk uzunlukları zamana bağlı olarak artış göstermekle beraber 0 ile 24 saatleri arasındaki fark anlamlılık ifade etmemektedir. Diğer tüm zamanlardaki ortalamalar arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$), Şekil 4.2.

2HP grubunun ortalamaları tüm zamanlarda birbirlerine yakın değerlerde olup aralarında anlamlı farklılık bulunamamıştır, Şekil 4.4. 6HP grubunda kuyruk uzunluğu açısından 24 ve 72. saatteki ölçümler arasında anlamlı fark yokken diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p = 0.000$), Şekil 4.6.

E2HP grubunda 0 ile 48. saatteki ve 24 ile 72. saatteki kuyruk uzunlukları aralarında anlamlılık yoktur. Diğer tüm zamanlar ikili karşılaştırıldığında aralarında anlamlı farklılık olduğu görülmektedir ($p = 0.000$), Şekil 4.8. E6HP grubunda kuyruk uzunlukları karşılaştırıldığında ise 24. ile 48. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yokken diğer tüm zamanlar arasında anlamlı fark bulunmaktadır ($p = 0.000$), Şekil 4.10.

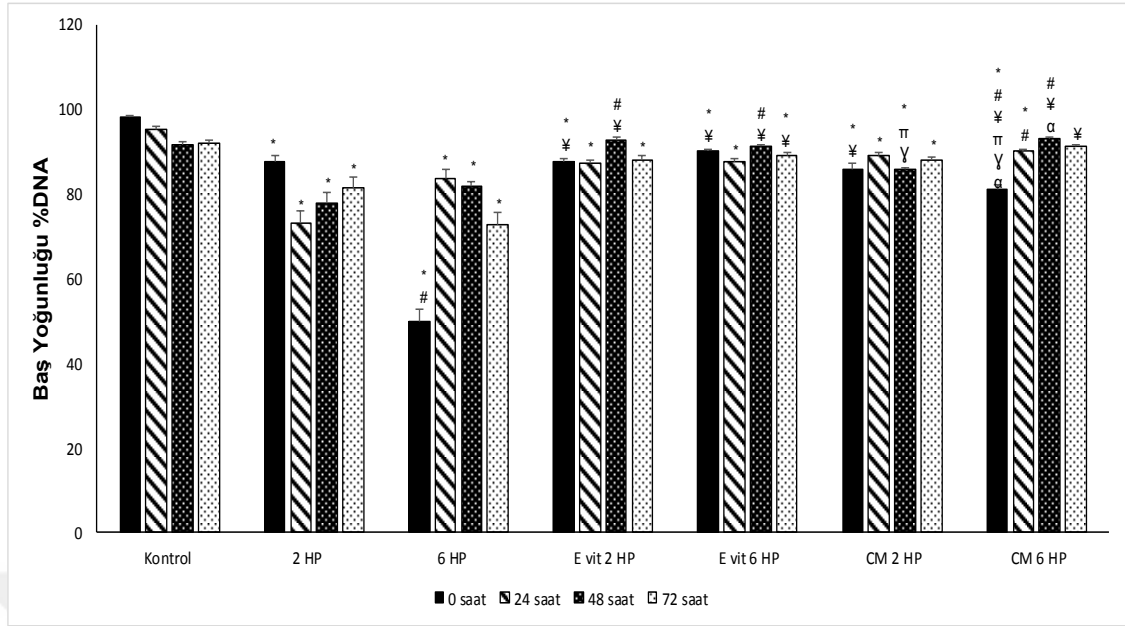
CM2HP grubunun kendi içerisindeki kuyruk uzunluğu karşılaştırılmasında 24 ile 72. saatteki ve 0 ile 48. saatteki ölçümler arasında anlamlılık yokken diğer tüm zamanlar arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0.05$), Şekil 4.11. CM6HP grubu içinde 48 ile 72. saatteki ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmezken diğer tüm zamanlar arasındaki fark anlamlıdır ($p = 0.000$), Şekil 4.13.



Şekil 4.4 2HP grubunun tüm parametrelerinin grup içi değerlendirilmesi
Kümelenmiş sütunlarda aynı işaretin taşınması anlamlılığı ifade eder, $p < 0,05$.

4.1.3. Baş Yoğunluğunun Belirlenmesi

Baş yoğunluğunun sıfırinci saatteki ortalamaları Tablo 4.1 de gösterilmiştir. Sıfırinci saatteki gruplar karşılaştırıldığında, tüm grupların baş yoğunluğu ortalamalarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı görüldü ($p=0.000$). Yirmi dördüncü saatteki ortalamaları Tablo 4.2 de gösterilmiştir. Yirmi dördüncü saatteki gruplar karşılaştırıldığında, tüm grupların baş yoğunluğu ortalamalarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı görüldü ($p=0.000$). Kırk sekizinci saatteki ortalamaları Tablo 4.3 de gösterilmiştir. Kırk sekizinci saatteki gruplar karşılaştırıldığında, baş yoğunluğu ortalamalarındaki azalma 2HP, 6HP, CM2HP gruplarında kontrole göre anlamlı olarak farklı idi ($p < 0.05$). E6HP grubunun ortalaması kontrole yakın olarak ölçüldü ve E2HP, CM6HP gruplarının ortalaması kontrole göre artarken bu üç grupta kontrole göre anlamlı farklılık gözlenmedi. Yetmiş ikinci saatteki ortalamaları Tablo 4.4 de gösterilmiştir. Yetmiş ikinci saatteki gruplar karşılaştırıldığında, baş yoğunluğu ortalamalarında CM6HP grubu hariç diğer tüm gruplarda kontrole göre anlamlı bir azalma görüldü ($p < 0.05$), Şekil 4.5.

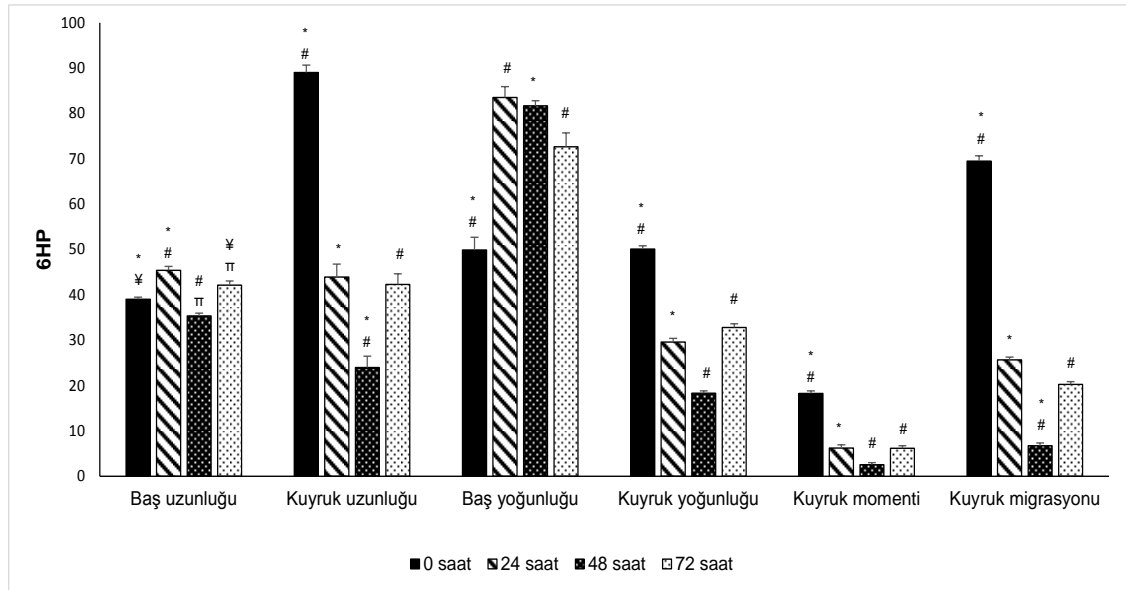


Şekil 4.5 Gruplar arasında baş yoğunluğunun değerlendirilmesi

- * ; kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$
- # ; 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$
- ¥ ; 6 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$
- π ; E 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$
- γ ; E 6 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$
- α ; CM 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$

Kontrol gruplarının kendi içlerinde 0, 24, 48 ve 72 saat sonraki ortalamalarında zamanla azalma gözlenmekle beraber bu azalma 48. ile 72. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı değilken diğer tüm zamanlar ikili karşılaştırıldığında aralarındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$), Şekil 4.2.

2HP grubunun baş yoğunluğu grup içinde değerlendirildiğinde sadece 0. ile 24. saatler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p < 0.05$), Şekil 4.4 6HP grubunda 24 ile 48 ve 48 ile 72. saatlerdeki baş yoğunlukları arasında anlamlı farklılık bulunmazken diğer tüm zamanların ikili karşılaştırılmasında aralarında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p < 0.05$), Şekil 4.6.



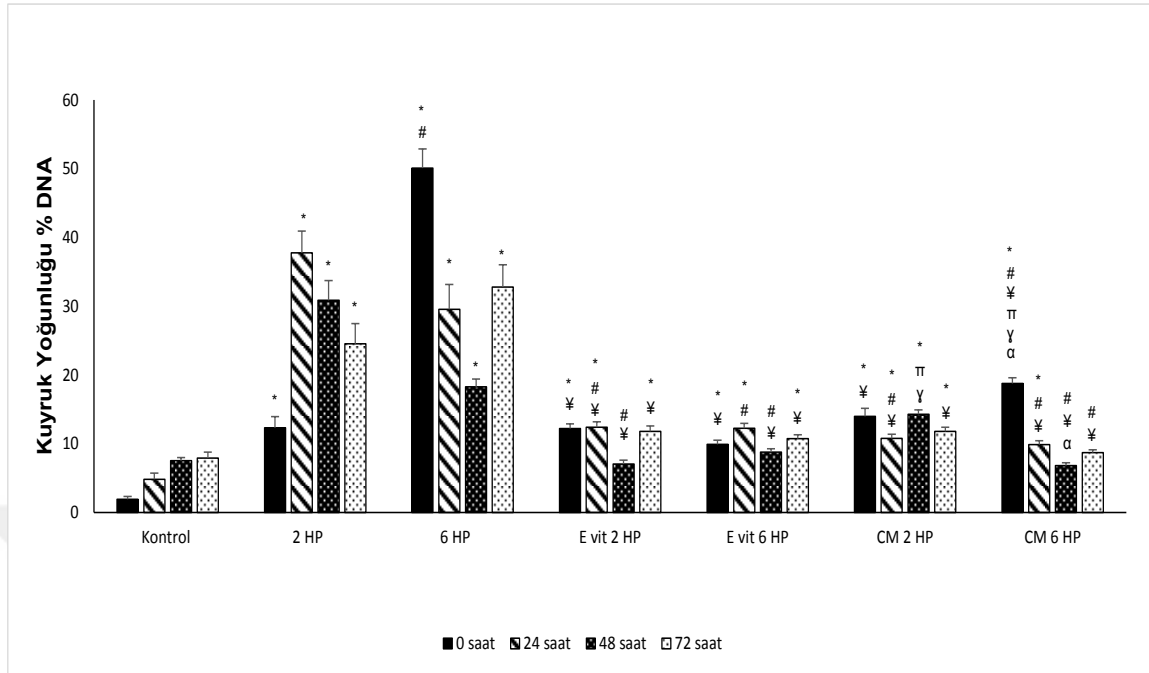
Şekil 4.6 6HP grubunun tüm parametrelerinin grup içi değerlendirilmesi
Kümelenmiş sütunlarda aynı işaretin taşınması anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$.

E2HP grubunda tüm zamanlardaki baş yoğunluğu ortalamaları ile 48. saatteki ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmakta ($p=0.000$) ancak diğer zamanlar arasında anlamlı farklılık yoktur, Şekil 4.8. E6HP grubunda ise sadece 24 ve 48. saatteki ortalamalar arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p < 0.05$), Şekil 4.10. Baş yoğunluğu CM2HP grubunda sadece 48. saatteki ortalama ile 24. ve 72. saatteki ortalamalar arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$), Şekil 4.11. CM6HP grubunda ise 72. saatteki baş yoğunluğu 48. saattekine göre anlamlı olarak düşükken 24 ile 72. saatteki karşılaştırmalar hariç diğer tüm zamanlardaki ölçümler arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$), Şekil 4.13.

4.1.4. Kuyruk Yoğunluğunun Belirlenmesi

Kuyruk yoğunluğunun sıfırinci saatteki ortalamaları karşılaştırıldığında, tüm grupların kuyruk yoğunluğu ortalamalarının kontrole göre anlamlı olarak arttığı görüldü ($p=0.000$), Tablo 4.1. Yirmi dördüncü saatteki ortalamaları Tablo 4.2 de gösterilmiştir. Yirmi dördüncü saatteki gruplar karşılaştırıldığında, tüm grupların kuyruk yoğunluğu ortalamalarının kontrole göre anlamlı olarak arttığı görüldü ($p=0.000$). Kırk sekizinci saatteki gruplar karşılaştırıldığında, kuyruk yoğunluğu ortalamalarındaki artış 2HP, 6HP, CM2HP gruplarında kontrole göre anlamlı olarak farklı idi Tablo 4.3, ($p=0.000$). E2HP ortalaması kontrole yakın, E6HP ortalaması kontrolden yüksek, CM6HP ortalaması kontrolden düşük olarak ölçülmesine rağmen kontrole göre anlamlı farklılık gözlenmedi. Yetmiş ikinci saatteki ortalamaları Tablo 4.4 de gösterilmiştir. Yetmiş ikinci saatteki gruplar karşılaştırıldığında, kuyruk yoğunluğunda tüm grupların

ortalamalarında kontrole göre artış gözlenirken; CM6HP grubu hariç diğer tüm gruplarda kontrole göre anlamlı farklılık görüldü ($p<0.05$), Şekil 4.7.



Şekil 4.7 Gruplar arasında kuyruk yoğunluğunun değerlendirilmesi

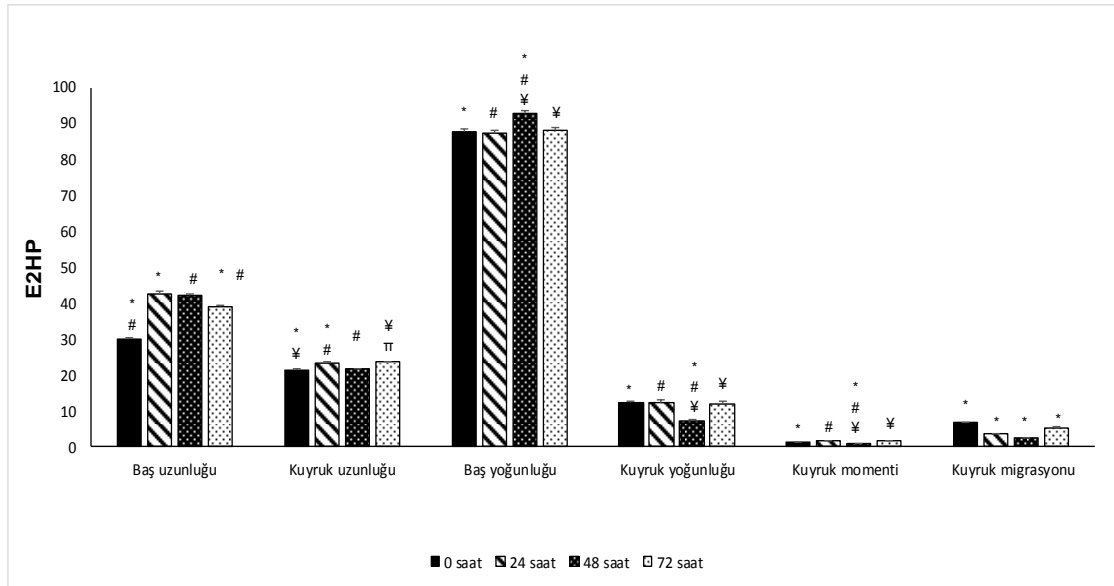
- * ; kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p<0.05$
- # ; 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p<0.05$
- ¥ ; 6 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p<0.05$
- π ; E 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p<0.05$
- γ ; E 6 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p<0.05$
- α ; CM 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p<0.05$

Kontrol grubunun kendi içinde 0, 24, 48 ve 72. saatlerdeki kuyruk yoğunlukları karşılaştırıldığında sadece 48 ve 72. saatteki ortalamaları arasında anlamlılık yokken diğer tüm zamanlar arasında anlamlılık bulunmaktadır ($p<0.05$), Şekil 4.2.

2HP grubunda 48 ile 24 ve 72. saatler arasında anlamlılık bulunmazken diğer tüm zamanlardaki karşılaştırmalarda aradaki fark anlamlıdır ($p<0.05$), Şekil 4.4.

6HP grubunda sadece 24 ile 48 ve 72. saatlerdeki kuyruk yoğunlukları arasında anlamlı farklılık bulunamamışken diğer zamanlar arasında anlamlı farklılık görülmüştür ($p<0.05$), Şekil 4.6.

E vitamini uygulanan gruplarda en düşük ortalama 48. saatte ölçülmüştür. E2HP grubunda sadece 48. saat kuyruk yoğunluğu ortalamaları ile 0. ve 24. ve 72. saat ortalamaları arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p=0.000$), Şekil 4.8. E6HP grubunda ise 48. saatteki kuyruk yoğunluğu 24. saatteki değerden anlamlı olarak daha azdır ($p<0.05$), Şekil 4.10.

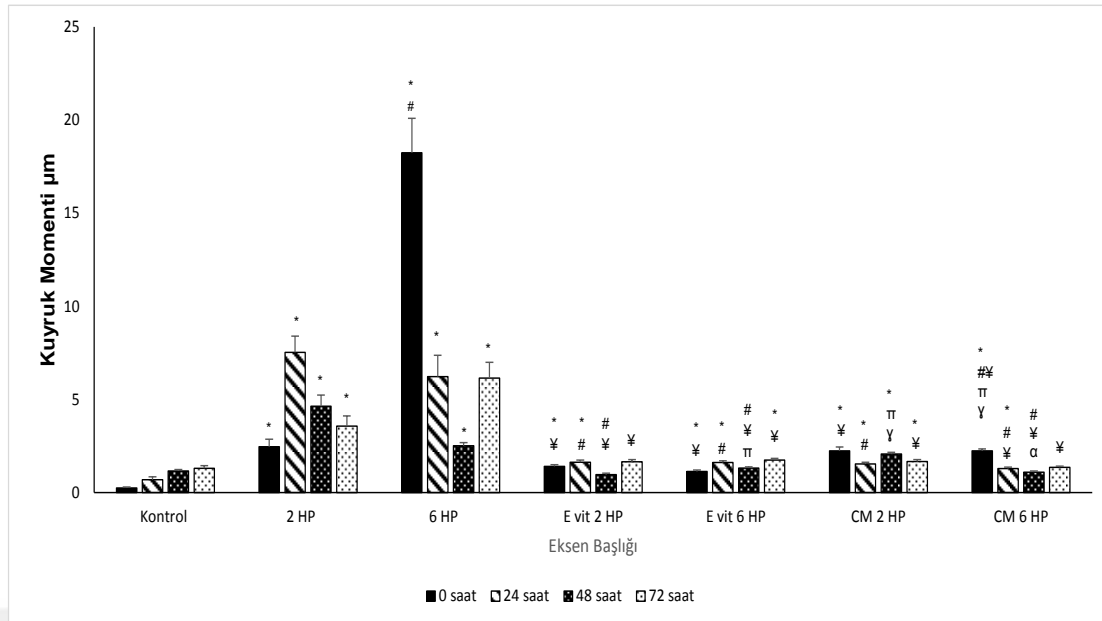


Şekil 4.8 E2HP grubunun tüm parametrelerinin grup içi değerlendirilmesi
Kümelenmiş sütunlarda aynı işaretin taşınması anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$.

CM2HP grubunda en yüksek ortalama 48 saat sonra ölçülmüştür. Bu grupta 24. ve 72. saatteki ortalamalar, 48. saatteki ortalamalardan anlamlı olarak azdır ($p < 0.05$). Diğer zamanlar arasında anlamlılık bulunmamaktadır, Şekil 4.11. CM6HP grubunda en düşük ortalama 48 saat sonra ve en yüksek ortalama 0. saatte ölçülmüştür. Sadece 24 ve 72. saatteki kuyruk yoğunlukları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yokken diğer zamanlar arasındaki farklar anlamlıdır ($p < 0.05$), Şekil 4.13.

4.1.5. Kuyruk Momentinin Belirlenmesi

Kuyruk momentinin sıfırinci saatteki ortalamaları Tablo 4.1 de gösterilmiştir. Sıfırinci saatteki gruplar karşılaştırıldığında, tüm grupların kuyruk momenti ortalamalarının kontrole göre anlamlı olarak arttığı görüldü ($p = 0.000$). Yirmi dördüncü saatteki ortalamaları Tablo 4.2 de gösterilmiştir. Yirmi dördüncü saatteki gruplar karşılaştırıldığında, tüm grupların kuyruk momenti ortalamalarının kontrole göre anlamlı olarak arttığı görüldü ($p = 0.000$). Kırk sekizinci saatteki ortalamaları Tablo 4.3 de gösterilmiştir. Kırk sekizinci saatteki gruplar karşılaştırıldığında, kuyruk momenti ortalamalarındaki artış 2HP, 6HP, CM2HP gruplarında kontrole göre anlamlı olarak farklı idi ($p = 0,000$). E2HP ve CM6HP grubunun ortalamasının azalması, E6HP grubunun ortalamasının artması kontrole göre anlamlı olarak farklı değildi. Yetmiş ikinci saatteki ortalamaları Tablo 4.4 de gösterilmiştir. Yetmiş ikinci saatteki gruplar karşılaştırıldığında, kuyruk momentinde tüm grupların ortalamalarında kontrole göre artış gözlenirken; E2HP ve CM6HP grupları hariç diğer tüm gruplarda kontrole göre anlamlı farklılık görüldü, ($p < 0.05$), Şekil 4.9.



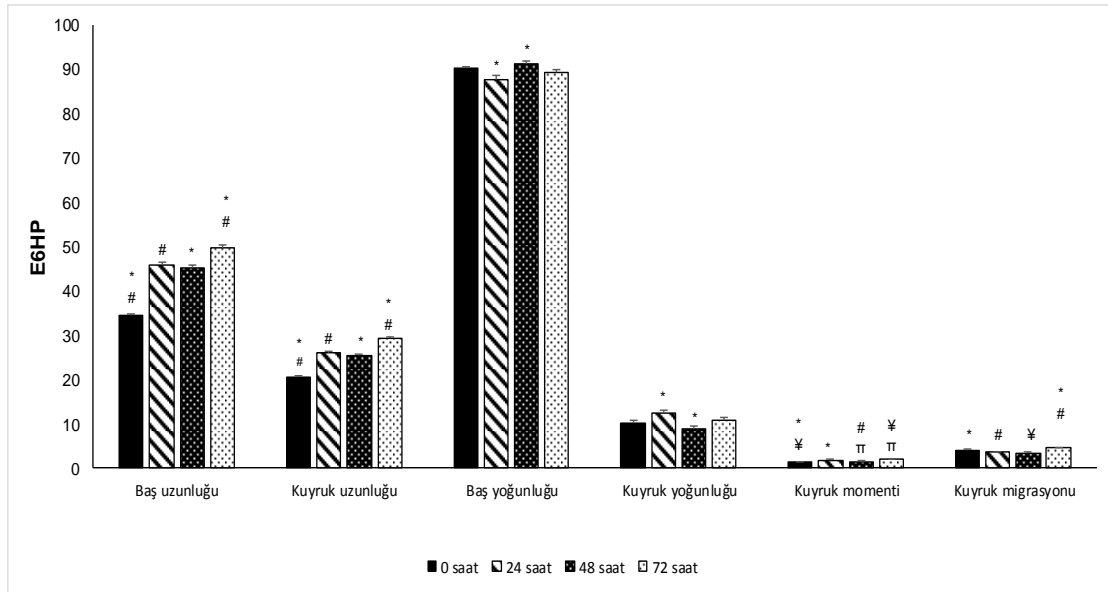
Şekil 4.9 Gruplar arasında kuyruk momentinin değerlendirilmesi

- * ; kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$
- # ; 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$
- ¥ ; 6 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$
- π ; E 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$
- Υ ; E 6 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$
- α ; CM 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$

Kontrol grubunun kendi içinde 0., 24., 48. ve 72. saat kuyruk momentum değerleri zamana bağlı olarak artış göstermiş bu artışlar 48. ile 72. saatler arasında anlamlı değilken diğer zamanlar arasında anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0.05$), Şekil 4.2.

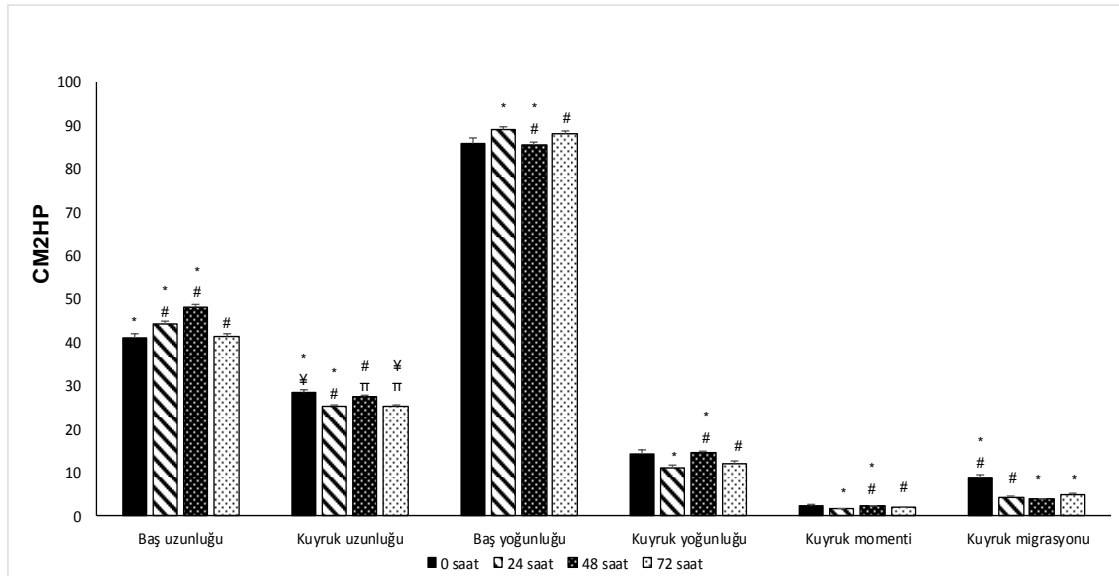
2HP grubunun en yüksek kuyruk momentini ortalaması 24 saat sonra ölçülmüştür ve 0. ve 72. saatteki ortalamalardan anlamlı olarak fazladır ($p < 0.05$), Şekil 4.4. 6HP grubunda ise kuyruk momentumları 24. saat ile 48. ve 72. saatleri arasında anlamlı farklılık göstermezken diğer tüm zamanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim göstermektedir ($p < 0.05$), Şekil 4.6.

E2HP grubunda en yüksek kuyruk momentumu 24. ve 72. saatte görülmüştür. Ancak sadece 48. saat ile 0. ve 24. ve 72. saat arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmaktadır ($p = 0.000$), Şekil 4.8. E6HP grubunda en yüksek ortalama 72 saat sonra ölçülmüştür ve bu zamandaki kuyruk momentumu ile 0. ve 48. saatteki ortalamalar ile aralarındaki fark anlamlı bulunurken ($p < 0.05$); 24. saatteki değerler arasında anlamlı değişim gözlenmemiştir. Bunun yanında 0 saatteki ortalamalar 24. saattekilerden anlamlı olarak azdır ($p = 0.000$), Şekil 4.10.



Şekil 4.10 E6HP grubunun tüm parametrelerinin grup içi değerlendirilmesi
Kümelenmiş sütunlarda aynı işaretin taşınması anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$

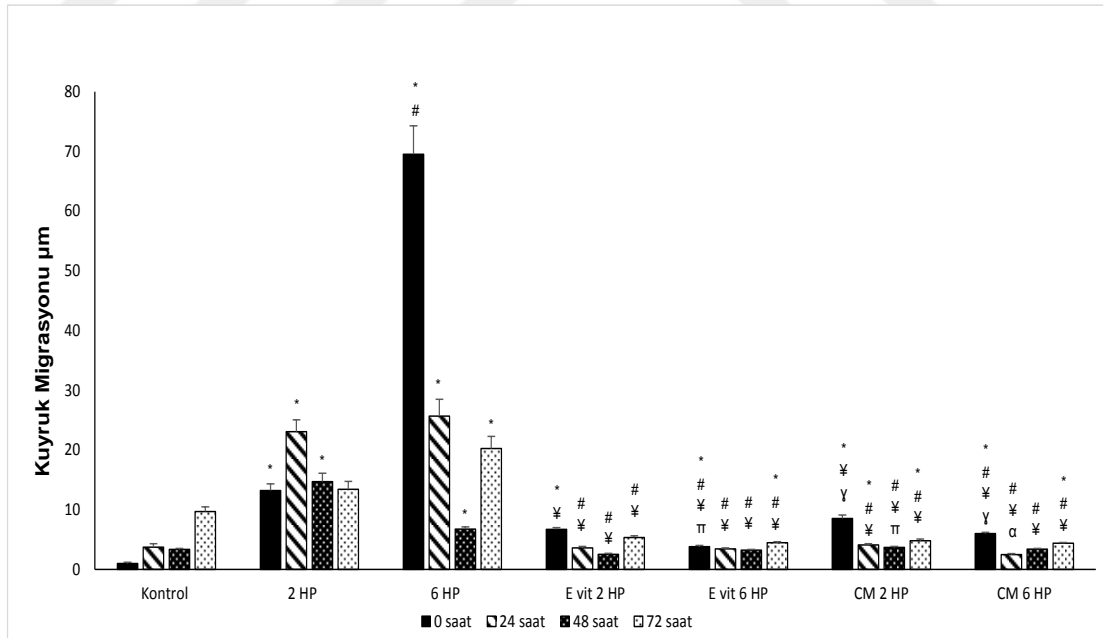
CM2HP grubunda en yüksek ortalama 0. saatte daha sonra 48. saatte ölçülmüştür. Ancak sadece 48. saatteki ortalamalar ile 24. ve 72. saattekiler arasında anlamlı farklılık vardır ($p < 0.05$). Diğer zamanlardaki ortalamalar arasında anlamlılık bulunmamaktadır, Şekil 4.11. CM6HP grubunda ise kuyruk momentumu 24. saat ile 48 ve 72. saatleri arasında anlamlılık göstermezken diğer tüm zamanlar arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p < 0.05$), Şekil 4.13.



Şekil 4.11 CM2HP grubunun tüm parametrelerinin grup içi değerlendirilmesi, $\text{ort} \pm \text{S.H.}$
Kümelenmiş sütunlarda aynı işaretin taşınması anlamlılığı ifade eder, $p < 0.05$

4.1.6. Kuyruk Migrasyonunun Belirlenmesi

Kuyruk migrasyonunun sıfırinci saatteki ortalamaları Tablo 4.1 de gösterilmiştir. Sıfırinci saatteki gruplar karşılaştırıldığında, tüm grupların kuyruk migrasyonu ortalamalarının kontrole göre anlamlı olarak arttığı görüldü ($p=0.000$). Yirmi dördüncü saatteki ortalamaları Tablo 4.2 de gösterilmiştir. Yirmi dördüncü saatteki gruplar karşılaştırıldığında, kuyruk migrasyonu ortalamalarındaki artış 2HP, 6HP, CM2HP gruplarında kontrole göre anlamlı olarak farklıydı ($p<0.05$). E2HP, E6HP, CM6HP gruplarındaki ortalamalardaki azalma kontrole göre anlamlı olarak farklı değildi. Kırk sekizinci saatteki ortalamaları Tablo 4.3 de gösterilmiştir. Kırk sekizinci saatteki gruplar karşılaştırıldığında, 2HP, 6HP gruplarındaki kuyruk migrasyonu ortalamalarındaki artış kontrole göre anlamlı olarak bulundu ($p=0.000$). Kontrole göre E2HP, E6HP ortalamaları azalırken; CM2HP, CM6HP gruplarının ortalamaları artarken anlamlı farklılık gözlenmedi. Yetmiş ikinci saatteki ortalamaları Tablo 4.4 de gösterilmiştir. Yetmiş ikinci saatteki gruplar karşılaştırıldığında, kuyruk migrasyonu ortalamalarında 6HP grubundaki artış, E6HP, CM2HP ve CM6HP gruplarındaki azalmanın kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.05$). Kontrole göre 2HP grubunun kuyruk migrasyonu ortalamasındaki artış ve E2HP grubunun ortalamasındaki azalma anlamlı değildi, Şekil 4.12.



Şekil 4.12 Gruplar arasında kuyruk migrasyonunun değerlendirilmesi

- * ; kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p<0.05$
- # ; 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p<0.05$
- ¥ ; 6 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p<0.05$
- π ; E 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p<0.05$
- Υ ; E 6 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p<0.05$
- α ; CM 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, $p<0.05$

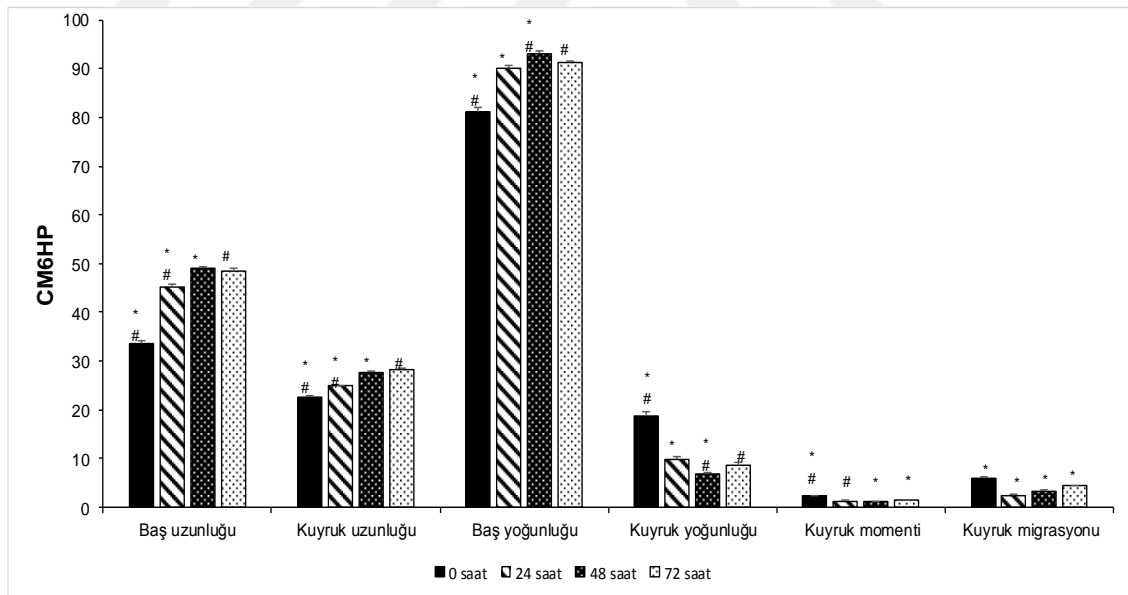
Kontrol grubunun kuyruk migrasyonu değerleri arasında tüm zamanlarda anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p<0.05$), Şekil 4.2.

2HP grubunda en yüksek kuyruk migrasyonu 24. saatte ölçülmüş olup 24. saatteki ortalamalar ile diğer zamanlardaki ortalamalar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$), Şekil 4.4.

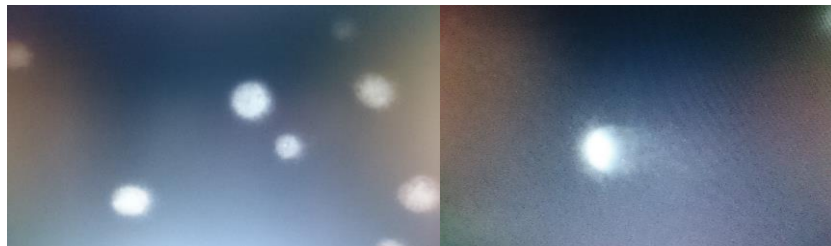
6HP grubunda ise kuyruk migrasyonu sadece 24. ve 72. saatler arasında anlamlı değişim göstermezken diğer tüm zamanlardaki değerler arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p=0.000$), Şekil 4.6.

E2HP grubunda en yüksek kuyruk migrasyonu 0. saatte, en düşüğe 48. saatte ölçülmüştür. Tüm zamanlardaki ortalamalar arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p<0.05$), Şekil 4.8. E6HP grubunda ise sadece 72. saatteki ortalamalar ile diğer zamanlarda ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p=0.000$), Şekil 4.10.

CM uygulanan gruplarda en yüksek ortalama 0. saatte ölçülmüştür. CM2HP grubunda sadece 24. saatteki ortalamalar ile 48. ve 72. saattekiler arasında anlamlı farklılık görülmemiş diğer tüm zamanlardaki kuyruk migrasyonu arasında anlamlı fark vardır ($p<0.05$), Şekil 4.11. CM6HP grubunda ise tüm zamanlardaki ortalamalar arasında anlamlı değişim gözlenmiştir ($p<0.05$), Şekil 4.13.



Şekil 4.13 CM6HP grubunun tüm parametrelerinin grup içi değerlendirilmesi
Kümelenmiş sütunlarda aynı işaretin taşınması anlamlılığı ifade eder, $p<0.05$



Şekil 4.14 Çalışmamızdaki hasarsız komet görüntüsü (solda), hasarlı komet görüntüsü (sağda)

Tablo 4.1 Tüm grupların sıfırinci saatteki komet parametrelerinin karşılaştırılması, ort±S.S.

	Kontrol	2 HP	6 HP	E 2HP	E 6HP	CM 2HP	CM 6HP	p
BU µm	49,82±5,33	49,57±9,51	39,04±23,31 ^{a,b}	30,02±4,26 ^{a,b,c}	34,37±3,59 ^{a,b,d}	41,10±8,54 ^{a,b,c,d,e}	33,63±4,17 ^{a,b,d,f}	0,000
KU µm	22,93±3,43	37,97±9,52 ^a	89,03±34,23 ^a	21,42±3,03 ^{b,c}	20,46±2,97 ^{a,b,c}	28,19±7,07 ^{a,b,c,d,e}	22,71±2,77 ^{b,c,e,f}	0,000
BY %DNA	98,09±4,07	87,69±14,68 ^a	49,91±23,11 ^{a,b}	87,80±7,16 ^{a,c}	90,08±5,96 ^{a,c}	86,00±11,63 ^{a,c}	81,24±8,51 ^{a,b,c,d,e,f}	0,000
KY %DNA	1,90±4,07	12,3±14,68 ^a	50,08±23,11 ^{a,b}	12,19±7,16 ^{a,c}	9,91±5,96 ^{a,c}	13,99±11,63 ^{a,c}	18,75±8,51 ^{a,b,c,d,e,f}	0,000
KMo µm	0,25±0,58	2,46±3,70 ^a	18,25±15,18 ^{a,b}	1,41±0,96 ^{a,c}	1,13±0,86 ^{a,c}	2,24±2,19 ^{a,c}	2,24±1,03 ^{a,b,c,d,e}	0,000
KMi µm	0,97±2,00	13,18±10,40 ^a	69,51±39,33 ^{a,b}	6,71±2,93 ^{a,c}	3,80±2,08 ^{a,b,c,d}	8,52±5,82 ^{a,c,e}	5,99±2,37 ^{a,b,c,e}	0,000

^a: kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

^b: 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

^c: 6 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

^d: E 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

^e: E 6 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

^f: CM 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

p= Tüm gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder

BU: Baş Uzunluğu, KU: Kuyruk Uzunluğu, BY: Baş Yoğunluğu,

KY: Kuyruk Yoğunluğu, KMo: Kuyruk momenti, KMi: Kuyruk Migrasyonu

Tablo 4.2 Tüm grupların yirmi dördüncü saatteki komet parametrelerinin karşılaştırılması, ortalama±S.S.

	Kontrol	2 HP	6 HP	E 2HP	E 6HP	CM 2HP	CM 6HP	p
BU μm	42,15±10,71	42,98±15,96	45,39±12,46	42,67±5,63	45,72±5,51 ^d	44,05±6,43	45,32±4,48	0,007
KU μm	23,18±7,60	39,83±14,33 ^a	43,92±18,66 ^a	23,24±2,93 ^{b,c}	25,77±3,25 ^{a,b,c,d}	25,15±3,31 ^{b,c}	24,81±2,61 ^{b,c}	0,000
BY %DNA	95,17±8,80	73,01±26,16 ^a	83,51±19,92 ^a	87,36±8,22 ^a	87,75±7,05 ^a	89,21±6,01 ^a	90,13±5,74 ^{a,b}	0,000
KY %DNA	4,82±8,80	37,76±28,82 ^a	29,56±29,72 ^a	12,38±7,96 ^{a,b,c}	12,24±7,05 ^{a,b}	10,78±6,01 ^{a,b,c}	9,86±5,74 ^{a,b,c}	0,000
KMo μm	0,69±1,45	7,53±7,91 ^a	6,23±9,46 ^a	1,63±1,16 ^{a,b}	1,61±0,93 ^{a,b}	1,54±0,94 ^{a,b}	1,29±0,83 ^{a,b,c}	0,000
KMi μm	3,73±5,68	23,07±17,81 ^a	25,66±23,25 ^a	3,58±2,45 ^{b,c}	3,41±1,71 ^{b,c}	4,08±2,26 ^{a,b,c}	2,48±1,46 ^{b,c,e}	0,000

^a: kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

^b: 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

^c: 6 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

^d: E 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

^e: E 6 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

p= Tüm gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder

BU: Baş Uzunluğu, KU: Kuyruk Uzunluğu, BY: Baş Yoğunluğu,

KY: Kuyruk Yoğunluğu, KMo: Kuyruk momenti, KMi: Kuyruk Migrasyonu

Tablo 4.3 Tüm grupların kırk sekizinci saatteki komet parametrelerinin karşılaştırılması, ort±S.S.

	Kontrol	2 HP	6 HP	E 2HP	E 6HP	CM 2HP	CM 6HP	p
BU µm	48,02±5,59	47,62±14,20	35,37±4,23 ^{a,b}	42,30±4,11 ^{a,b,c}	45,19±5,16 ^{c,d}	48,11±6,28 ^{c,d}	48,90±4,99 ^{c,d,e}	0,000
KU µm	26,91±2,77	38,23±11,62 ^a	23,97±2,94 ^{a,b}	21,64±2,61 ^{a,b,c}	25,27±2,66 ^{b,c,d}	27,35±3,20 ^{b,c,d,e}	27,58±2,52 ^{b,c,d,e}	0,000
BY %DNA	91,71±5,66	77,81±22,68 ^a	81,70±9,10 ^a	92,94±5,59 ^{b,c}	91,20±4,77 ^{b,c}	85,71±6,20 ^{a,d,e}	93,18±4,21 ^{b,c,f}	0,000
KY %DNA	7,52±4,58	30,87±26,08 ^a	18,29±9,10 ^a	7,05±5,59 ^{b,c}	8,79±4,77 ^{b,c}	14,28±6,20 ^{a,d,e}	6,81±4,21 ^{b,c,f}	0,000
KMo µm	1,16±0,79	4,64±5,34 ^a	2,51±1,42 ^a	0,96±0,84 ^{b,c}	1,32±0,68 ^{b,c,d}	2,07±0,93 ^{a,d,e}	1,10±0,67 ^{b,c,f}	0,000
KMi µm	3,35±1,55	14,68±12,96 ^a	6,73±3,15 ^a	2,50±1,99 ^{b,c}	3,22±1,46 ^{b,c}	3,68±1,54 ^{b,c,d}	3,37±1,64 ^{b,c}	0,000

^a: kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

^b: 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

^c: 6 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

^d: E 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

^e: E 6 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

^f: CM 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

p= Tüm gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder

BU: Baş Uzunluğu, KU: Kuyruk Uzunluğu, BY: Baş Yoğunluğu,

KY: Kuyruk Yoğunluğu, KMo: Kuyruk momenti, KMi: Kuyruk Migrasyonu

Tablo 4.4 Tüm grupların yetmiş ikinci saatteki komet parametrelerinin karşılaştırılması, ort±S.S

	Kontrol	2 HP	6 HP	E 2HP	E 6HP	CM 2HP	CM 6HP	p
BU µm	45,80±9,36	44,99±13,06	42,16±14,47	39,11±4,48 ^{a,b}	49,65±4,70 ^{a,b,c,d}	41,38±6,02 ^{a,e}	48,55±5,44 ^{a,b,c,d,f}	0,000
KU µm	31,96±7,79	36,58±12,75	42,28±14,82 ^a	23,58±2,61 ^{a,b,c}	29,15±2,45 ^{b,c,d}	25,13±3,43 ^{a,b,c,e}	28,21±2,79 ^{b,c,d,f}	0,000
BY %DNA	92,08±8,53	81,50±21,53 ^a	72,66±25,19 ^a	88,21±7,95 ^a	89,27±5,87 ^{a,c}	88,20±6,10 ^a	91,28±4,29 ^c	0,000
KY %DNA	7,91±8,53	24,52±26,75 ^a	32,81±26,75 ^a	11,78±7,95 ^{a,c}	10,72±5,87 ^{a,c}	11,79±6,10 ^{a,c}	8,71±4,29 ^{b,c}	0,000
KMo µm	1,30±1,43	3,57±4,93 ^a	6,15±7,02 ^a	1,65±1,22 ^c	1,74±0,93 ^{a,c}	1,67±1,04 ^{a,c}	1,36±0,64 ^c	0,000
KMi µm	9,66±7,67	13,40±12,12	20,24±16,67 ^a	5,35±2,95 ^{b,c}	4,47±1,40 ^{a,b,c}	4,81±2,61 ^{a,b,c}	4,37±1,57 ^{a,b,c}	0,000

^a: kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

^b: 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

^c: 6 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

^d: E 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

^e: E 6 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

^f: CM 2 HP grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder, p<0.05

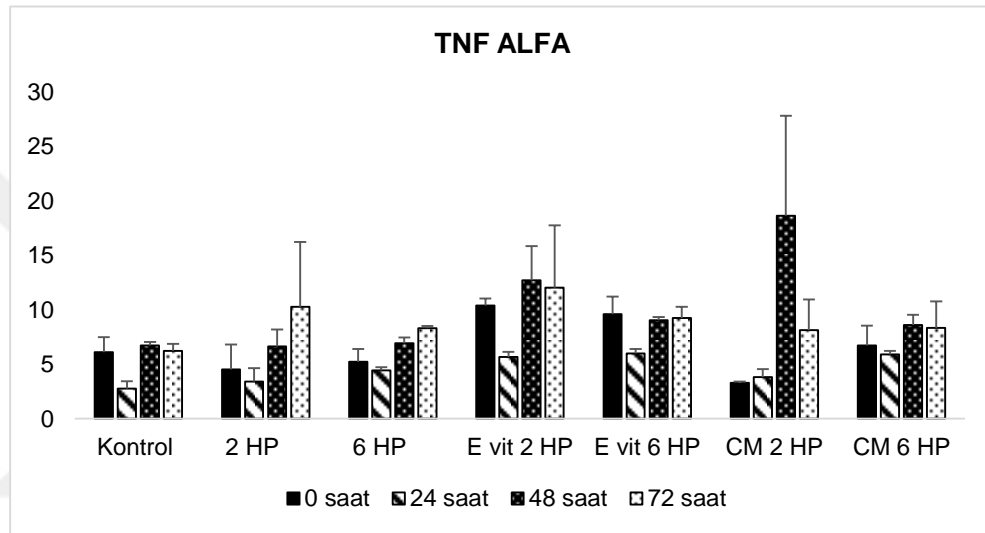
p= Tüm gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder

BU: Baş Uzunluğu, KU: Kuyruk Uzunluğu, BY: Baş Yoğunluğu,

KY: Kuyruk Yoğunluğu, KMo: Kuyruk momenti, KMi: Kuyruk Migrasyonu

4.2. TNF α Seviyesinin Belirlenmesi

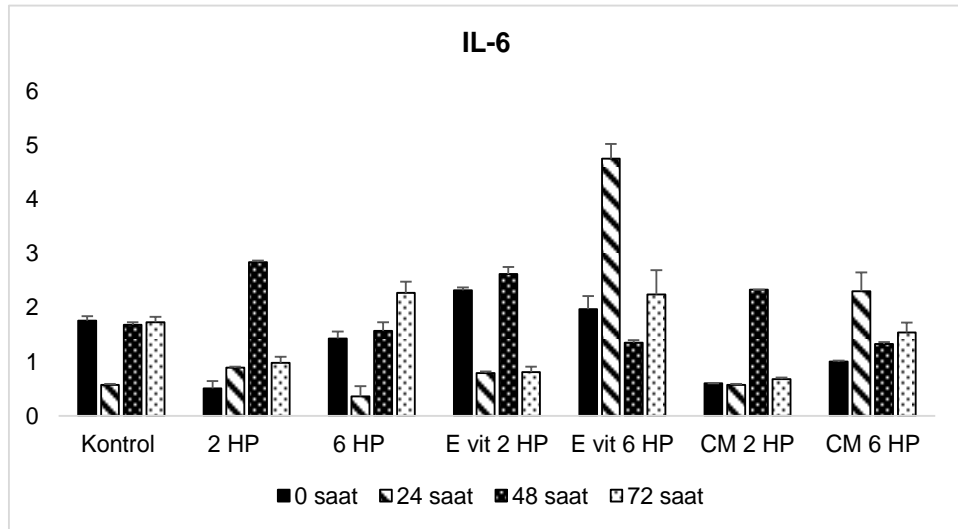
Tüm gruplarda 24 ve 72 saat sonra ölçülen TNF α düzeyi, kontrol grubundan yüksek olup aralarında anlamlılık yoktur ($p=0.066$ ve 0.688), Tablo 4.6 ve 4.8. TNF α seviyesi 48. saatte kontrol grubu ile 2HP ve 6HP grubunun yakın, diğer gruplarınkı kontrolden yüksek olarak ölçülmesine rağmen aralarında anlamlı farklılık gözlenmedi (0.164), Tablo 4.7. Hemen yapılan 0. saatteki ölçümlerde 2HP, 6HP ve CM2HP gruplarınkı kontrol grubundan düşük, diğer gruplarınkı ise yüksek olarak ölçülmekle beraber aralarında anlamlı farklılık gözlenmedi (0.071), Tablo 4.5, Şekil 4.14.



Şekil 4.15 Gruplar arasında TNF Alfa seviyelerinin değerlendirilmesi
TNF α birimi pg/ml

4.3. IL-6 Seviyesinin Belirlenmesi

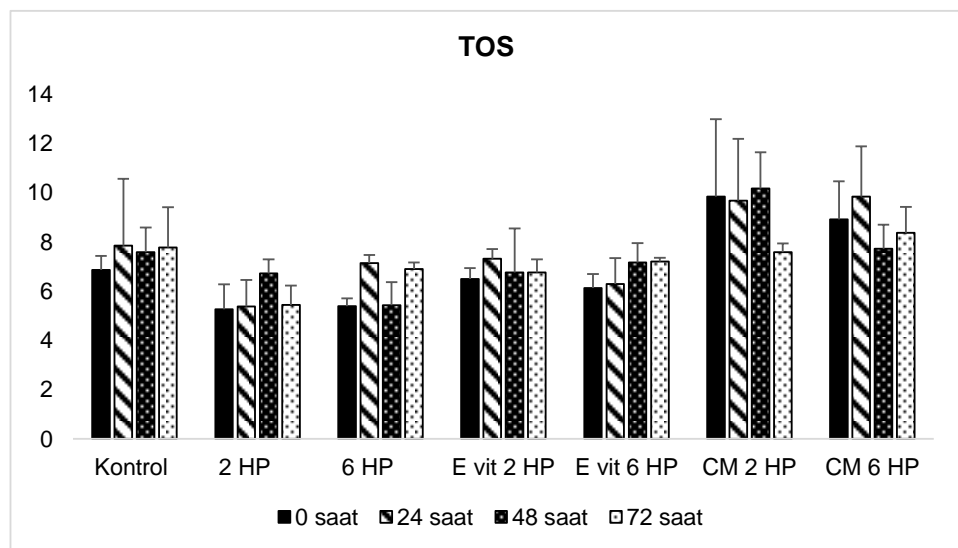
Sadece HP ve CM gruplarında 0. saatte ölçülen IL-6 seviyeleri kontrole göre düşükken; E vitamini gruplarında yüksek olup aralarında anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p=0.053$), Tablo 4.5. Sonraki ölçüm zamanı olan 24. saatteki 2HP, E2HP, E6HP, CM6HP gruplarının IL-6 seviyeleri kontrole göre artarken; 6HP grubunda azalmış ve CM2HP grubunda değişmemiş olup istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0.053$), Tablo 4.6. IL-6 seviyeleri 48. saatte 2HP, E2HP ve CM2HP gruplarında kontrole göre yüksekken; 6HP, E6HP ve CM6HP gruplarında düşük olup aralarında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0.056$), Tablo 4.7. Tüm CM grupları, 2HP ve E2HP gruplarının 72. saatteki IL-6 seviyeleri kontrole göre düşükken; 6HP, E6HP gruplarınkı yüksek olup aralarında anlamlılık bulunmamıştır ($p=0.067$), Tablo 4.8. Tüm zamanlardaki gruplar arası değerlendirme grafik olarak sunulmuştur (Şekil 4.15).



Şekil 4.16 Gruplar arasında IL-6 seviyelerinin değerlendirilmesi
IL-6 birimi pg/ml

4.4. TOS Değerlendirilmesi

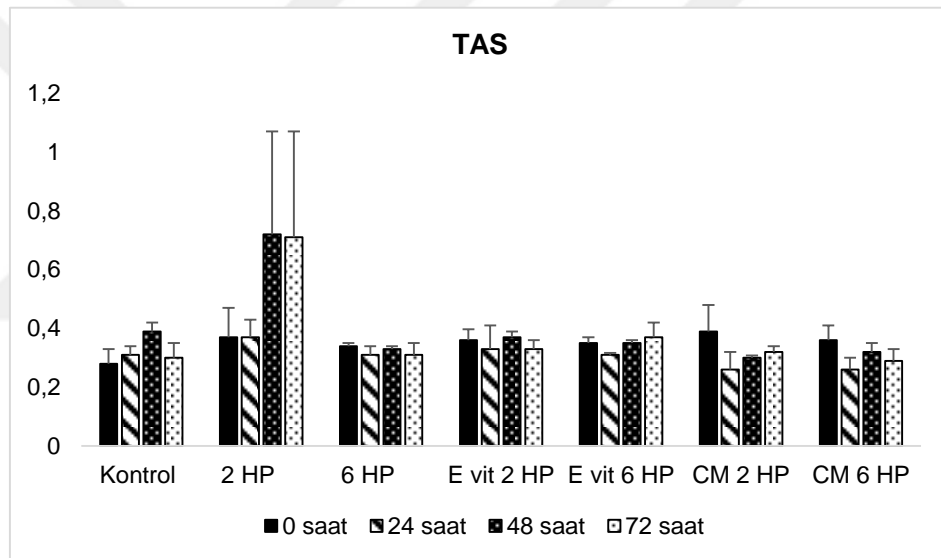
Çalışmamızda sadece HP uygulanan ve E vitamini gruplarının 0, 24 ve 48. saatteki TOS değerleri kontrolden düşük, CM gruplarının ise yüksek olmasına rağmen aralarında anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0.142$, $p=0.181$, $p=0.261$), Tablo 4.5 ve Tablo 4.6, Tablo 4.7. sadece HP uygulanan ve E vitamini gruplarına ilaveten CM2HP grubunun da 72. saatteki TOS değerleri kontrole göre düşükken CM6HP grubunun yüksek olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p= 0.147$), Tablo 4.8. Tüm zamanlardaki gruplar arası değerlendirme grafik olarak sunulmuştur (Şekil 4.16).



Şekil 4.17 Gruplar arasında TOS değerlendirilmesi
TOS birimi µmol H₂O₂ Equiv./L

4.5. TAS Değerlendirilmesi

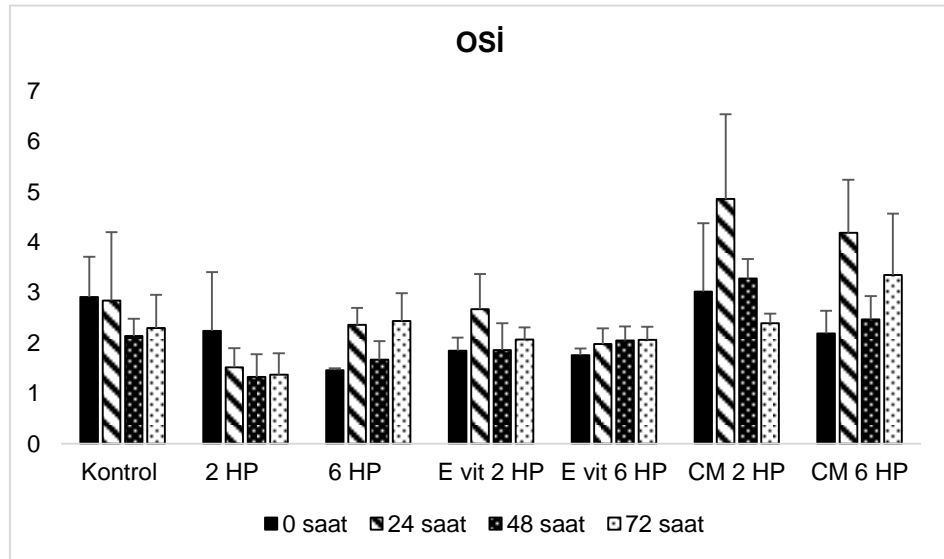
Çalışmamızda tüm grupların 0. saatteki TAS değerleri kontrole göre yüksek olup aralarında anlamlı farklılık bulunmamıştır (0.813), Tablo 4.5. Sonraki ölçüm zamanı olan 24. Saatteki TAS değerleri 2HP ve E2HP gruplarında kontrolden yüksek, 6HP ve E6HP gruplarında kontrole yakın ve CM gruplarında kontrolden düşük olup anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p=0.875$), Tablo 4.6. Sadece 2HP grubunun 48. saatteki TAS değerleri kontrolden yüksek olup diğer tüm gruplarınkine birbirine yakın olup kontrolden düşüktür, gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p=0.163$), Tablo 4.7. TAS değerleri 72. saatte 2HP grubu için kontrolden oldukça yüksek, diğer tüm gruplarda kontrole yakın ama ondan yüksek değerlerde, sadece CM6HP grubunda kontrolden düşük olup aralarında anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p=0.906$), Tablo 4.8. Tüm zamanlardaki gruplar arası değerlendirme grafik olarak sunulmuştur (Şekil 4.17).



Şekil 4.18 Gruplar arasında TAS değerlendirilmesi
TAS birimi mmolTrolox Equiv./L

4.6. OSİ Değerlendirilmesi

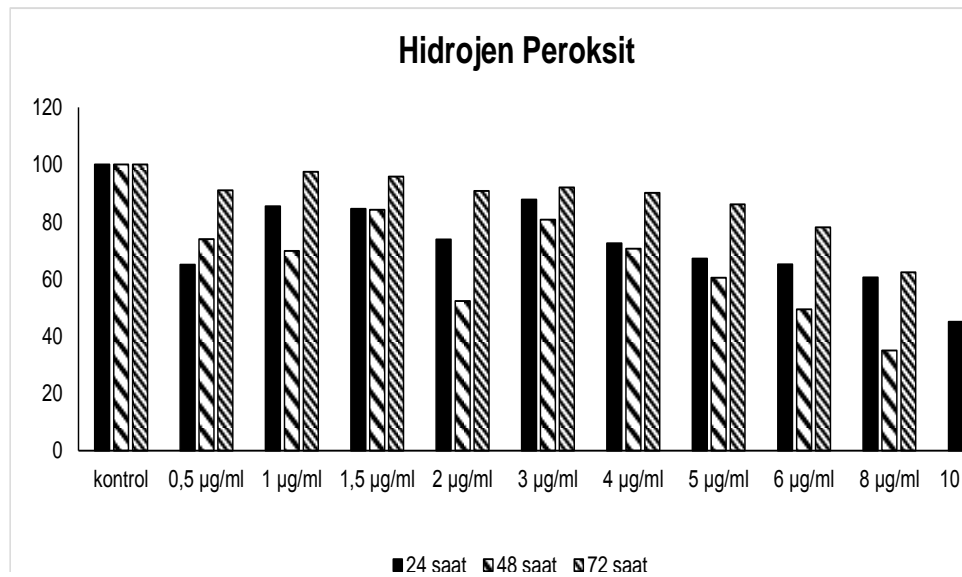
Çalışmamızda sadece CM2HP grubunun 0. saatteki OSİ değeri kontrolden yüksek, diğer tüm gruplarınkine düşük olup aralarında anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0.478$), Tablo 4.5. Sadece CM gruplarının 24 ve 48. saatteki OSİ değerleri kontrole göre yüksek, diğerlerinin ise düşük olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0.298$, $p=0.086$), Tablo 4.6, Tablo 4.7. CM ve 6HP gruplarının 72. saatteki OSİ değerleri kontrolden yüksek, diğerlerinin ise düşük olup aralarında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0.422$), Tablo 4.8. Tüm zamanlardaki gruplar arası değerlendirme grafik olarak sunulmuştur (Şekil 4.18).



Şekil 4.19 Gruplar arasında OSİ değerlendirilmesi
Oksidatif Stres İndeksi birimi arbitrary unit

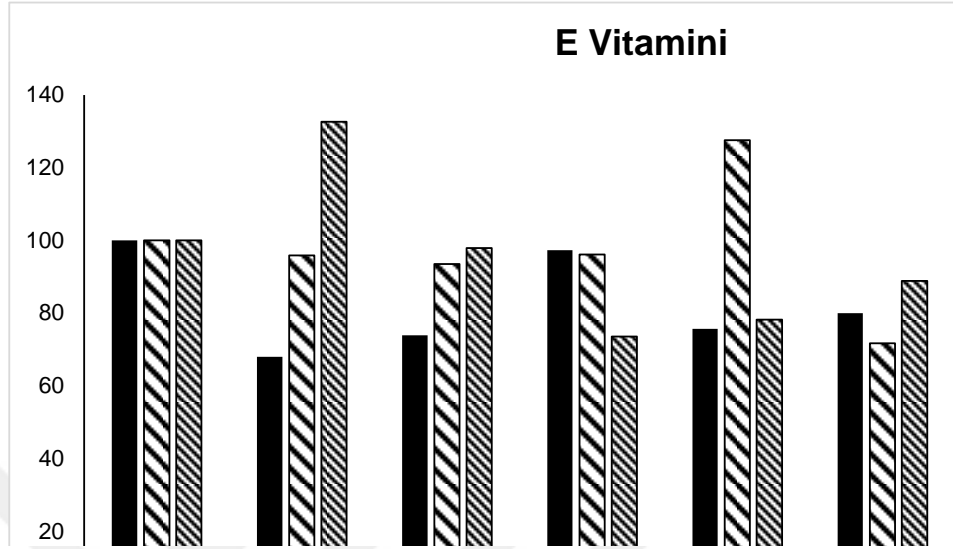
4.7. XTT Değerlendirilmesi

Çalışmamızda DPSC'ye 2 µg/ml HP uygulanması sonucunda XTT ile hücre canlılığı değerlendirildiğinde uygulamadan 24 saat sonra hücrelerin yaklaşık %73'ü, 48 saat sonra %52'si ve 72 saat sonra %90'ı canlılıklarını korumaktaydı. 6 µg/ml HP uygulanması sonucunda XTT ile hücre canlılığı değerlendirildiğinde uygulamadan 24 saat sonra hücrelerin yaklaşık %65'i, 48 saat sonra %49'u ve 72 saat sonra %78'i canlıydı.



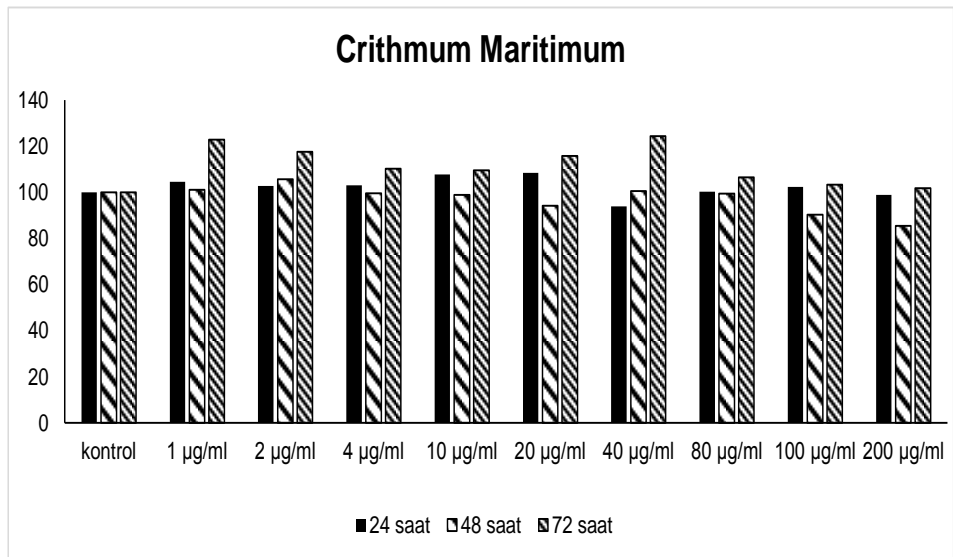
Şekil 4.20 Hidrojen peroksitin XTT sonuçlarının değerlendirilmesi

Çalışmamızda DPSC'ye 100 µM E vitamini uygulanması sonucunda XTT ile hücre canlılığı değerlendirildiğinde uygulamadan 24 saat sonra hücrelerin yaklaşık %67'si, 48 saat sonra %95'i ve 72 saat sonra %132'si canlılıklarını korumaktaydı.



Şekil4.21 E vitamininin XTT sonuçlarının değerlendirilmesi

Çalışmamızda DPSC'ye 2µg/ml Crithmum maritimum uygulanması sonucunda XTT ile hücre canlılığı değerlendirildiğinde uygulamadan 24 saat sonra hücrelerin yaklaşık %102'si, 48 saat sonra %105'i ve 72 saat sonra %117'si canlılıklarını korumaktaydı.



Şekil4.22 Crithmum maritimumun XTT sonuçlarının değerlendirilmesi

Tablo 4.5 Gruplar arası sıfırinci saatteki TNF- α , IL-6, TOS, TAS ve OSİ seviyelerinin karşılaştırılması, ortalama±S.S.

	Kontrol	2 HP	6 HP	E 2HP	E 6HP	CM 2HP	CM 6HP	P
TNF-α pg/ml	6,11±1,92	4,53±3,24	5,24±2,02	10,39±0,89	9,59±2,79	3,28±0,21	6,72±3,14	0,071
IL-6 pg/ml	1,76±0,11	0,51±0,19	1,43±0,19	2,32±0,07	1,97±0,34	0,60±0,00	1,00±0,03	0,053
TOS μ mol H ₂ O ₂ Equiv./L	6,87±1,14	5,27±2,02	5,40±0,55	6,50±0,88	6,13±1,14	9,85±6,28	8,92±2,67	0,142
TAS mmolTrolox Equiv./L	0,28±0,10	0,37±0,20	0,34±0,03	0,36±0,07	0,35±0,05	0,39±0,18	0,36±0,11	0,813
OSİ arbitrary unit	2,91±1,61	2,24±2,34	1,46±0,08	1,85±0,53	1,76±0,27	3,02±2,72	2,19±0,77	0,478

p=Tüm gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder. TNF α : Tumor Nekroz Faktör Alfa, IL-6: Interleukin 6, TOS: Toplam Oksidan Seviye, TAS: Toplam Antioksidan Seviye, OSİ: Oksidatif Stres İndeksi.

Tablo 4.6 Gruplar arası yirmi dördüncü saatteki TNF- α , IL-6, TOS, TAS ve OSİ seviyelerinin karşılaştırılması, ort \pm S.S.

	Kontrol	2 HP	6 HP	E 2HP	E 6HP	CM 2HP	CM 6HP	p
TNF-α pg/ml	2,77 \pm 1,16	3,41 \pm 2,11	4,43 \pm 0,44	5,68 \pm 0,80	6,00 \pm 0,58	3,81 \pm 1,03	5,90 \pm 0,43	0,066
IL-6 pg/ml	0,57 \pm 0,03	0,89 \pm 0,03	0,36 \pm 0,26	0,79 \pm 0,04	4,75 \pm 0,38	0,57 \pm 0,03	2,30 \pm 0,49	0,053
TOS μ mol H ₂ O ₂ Equiv./L	7,86 \pm 5,42	5,38 \pm 2,17	7,15 \pm 0,64	7,32 \pm 0,79	6,29 \pm 2,12	9,68 \pm 5,03	9,85 \pm 4,08	0,181
TAS mmol H ₂ O ₂ Equiv./L	0,31 \pm 0,07	0,37 \pm 0,12	0,31 \pm 0,06	0,33 \pm 0,17	0,31 \pm 0,01	0,26 \pm 0,13	0,26 \pm 0,08	0,875
OSİ arbitrary unit	2,84 \pm 2,73	1,52 \pm 0,77	2,36 \pm 0,68	2,67 \pm 1,40	1,98 \pm 0,63	4,86 \pm 3,37	4,19 \pm 2,11	0,298

p=Tüm gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder. TNF α : Tumor Nekroz Faktör Alfa, IL-6: Interleukin 6, TOS: Toplam Oksidan Seviye, TAS: Toplam Antioksidan Seviye, OSİ: Oksidatif Stres İndeksi.

Tablo 4.7 Gruplar arası kırk sekizinci saatteki TNF- α , IL-6, TOS, TAS ve OSİ seviyelerinin karşılaştırılması, ort \pm S.S.

	Kontrol	2 HP	6 HP	E 2HP	E 6HP	CM 2HP	CM 6HP	p
TNF-α pg/ml	6,73 \pm 0,44	6,62 \pm 2,71	6,94 \pm 0,74	12,71 \pm 5,44	9,03 \pm 0,44	18,62 \pm 15,91	8,61 \pm 1,32	0,164
IL-6 pg/ml	1,68 \pm 0,07	2,84 \pm 0,04	1,57 \pm 0,22	2,62 \pm 0,19	1,35 \pm 0,07	2,33 \pm 0,00	1,33 \pm 0,04	0,056
TOS μ molH ₂ O ₂ Equiv/L	7,59 \pm 1,74	6,72 \pm 1,01	5,43 \pm 1,88	6,76 \pm 3,59	7,17 \pm 1,57	10,17 \pm 2,96	7,73 \pm 1,94	0,261
TAS mmolH ₂ O ₂ Equiv/L	0,39 \pm 0,07	0,72 \pm 0,71	0,33 \pm 0,03	0,37 \pm 0,04	0,35 \pm 0,03	0,30 \pm 0,01	0,32 \pm 0,06	0,163
OSİ arbitrary unit	2,14 \pm 0,59	1,33 \pm 0,78	1,67 \pm 0,75	1,86 \pm 1,06	2,05 \pm 0,57	3,28 \pm 0,78	2,47 \pm 0,92	0,086

p=Tüm gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder. TNF α : Tumor Nekroz Faktör Alfa, IL-6: Interleukin 6, TOS: Toplam Oksidan Seviye, TAS: Toplam Antioksidan Seviye, OSİ: Oksidatif Stres İndeksi.

Tablo 4.8 Gruplar arası yetmiş ikinci saatteki TNF- α , IL-6, TOS, TAS ve OSİ seviyelerinin karşılaştırılması, ort \pm S.S.

	Kontrol	2 HP	6 HP	E 2HP	E 6HP	CM 2HP	CM 6HP	p
TNF-α pg/ml	6,21 \pm 1,05	10,27 \pm 10,29	8,30 \pm 0,29	12,03 \pm 9,91	9,24 \pm 1,81	8,12 \pm 4,93	8,32 \pm 4,25	0,688
IL-6 pg/ml	1,73 \pm 0,14	0,98 \pm 0,15	2,27 \pm 0,30	0,81 \pm 0,14	2,24 \pm 0,64	0,68 \pm 0,04	1,54 \pm 0,26	0,067
TOS μ molH ₂ O ₂ Equiv/L	7,78 \pm 2,83	5,44 \pm 1,58	6,90 \pm 0,54	6,76 \pm 1,08	7,21 \pm 0,30	7,59 \pm 0,70	8,38 \pm 2,10	0,147
TAS mmolH ₂ O ₂ Equiv/L	0,30 \pm 0,10	0,71 \pm 0,72	0,31 \pm 0,08	0,33 \pm 0,07	0,37 \pm 0,10	0,32 \pm 0,05	0,29 \pm 0,09	0,906
OSİ arbitrary unit	2,30 \pm 1,15	1,37 \pm 0,86	2,44 \pm 1,11	2,07 \pm 0,49	2,06 \pm 0,53	2,39 \pm 0,38	3,35 \pm 2,45	0,422

p=Tüm gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder. TNF α : Tumor Nekroz Faktör Alfa, IL-6: Interleukin 6, TOS: Toplam Oksidan Seviye
TAS: Toplam Antioksidan Seviye, OSİ: Oksidatif Stres İndeksi.

5. TARTIŞMA

Modern yaşam ile birlikte insanların dış görünüşüne verdikleri önem de hızla artmaktadır. İnsanlar için yüz özellikle de diş estetiği ön plana çıkmıştır. Estetik diş hekimliğinde en çok uygulanan yöntemlerden biri de diş beyazlatmadır. Teknolojideki hızlı gelişim de insanların bu isteklerini karşılar nitelikte olup sürekli yeni diş beyazlatma ürünleri piyasaya sürülmektedir. Diş beyazlatma, diş hekimlerinin ofislerinde yapılabildiği gibi marketlerden bile alınabilen yeni ürünler sayesinde evde de yapılabilmektedir. Diğer taraftan diş beyazlatıcıların içeriğindeki peroksit nedeniyle hücresel hasar oluşturabildikleri öne sürülmektedir. İnsanlarda 45 dakika %38 HP uygulandığında alt keser dişlerde, koronal pulpada parsiyal nekroz ve kök pulpasında orta dereceli enflamatuar cevap gözlemlendiği bildirilmiştir (Costa vd 2010).

Çalışmamız kapsamında, diş beyazlatıcı ajan olarak hidrojen peroksit uygulanmasının diş pulpası kök hücrelerinde (DPSC), DNA hasarı oluşturup oluşturmadığını, oksidatif süreçleri ve enflamatuar belirteçleri nasıl etkilediğini araştırdık. Ayrıca hidrojen peroksitin olası olumsuz etkilerini azaltmada antioksidan olarak kullanılan E vitamininin ve antioksidan etkileri olabileceği düşünülen *Crithmum Maritimum* bitkisinin uçucu yağının etkili olup olmadığını araştırdık.

Vital diş beyazlatmada diş beyazlatıcı ajan olarak kullanılan HP ve ürünlerinin mineralize diş dokularına ve oradan da pulpaya difüze olduğu kabul edilmektedir (Costa vd 2010, Cintra 2013). HP, difüzyon sırasında sadece kromoforlar ile değil, aynı zamanda diş yapısı ile de etkileşim içindedir (Kwon vd 2015). HP'nin pulpa odasına difüze olan miktarının, konsantrasyon ve uygulama zamanına bağlı olarak değiştiği bildirilmektedir (Benetti vd 2004). Bu nedenle, etkili beyazlatmadan ödün vermeden, HP'in pulpa odasına penetrasyonunu en aza indirecek optimum konsantrasyonun ve uygulama süresinin ayarlanması gerektiği bildirilmektedir (Kwon vd 2015).

Cotran ve arkadaşları tarafından (2000) diş beyazlatma ürünlerindeki HP'in, hücre membranından kolaylıkla geçip sitoplazmada, Fe⁺² veya Cu⁺² metal iyonları varlığında enzimatik olmayan süreçlerle, Haber–Weiss, Fenton reaksiyonu olarak

bilinen tepkimeler sonucu hidroksil radikallerine dönüştüğü bildirilmiştir (Ribeiro vd 2005). Weitzman (1986), Asad (1991), Zouain-Ferreira ve arkadaşları (2002) tarafından HP türeviden olan hidroksil radikallerinin ve serbest oksijen radikallerinin geniş anlamda reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırıldığı ve ROT tarafından indüklenen oksidatif stresin DNA kırıklarına, mutasyonlara, karsinogeneze neden oldukları bildirilmiştir (Ribeiro vd 2005). Majno ve Joris (1995) ROT etkisi ile sitoplazma iskeletinde meydana gelen hasarın sitokinezi etkilemesi sonucunda kromozom migrasyonunun bozulduğu bildirmiştir (Klaric vd 2013).

Çalışmamız literatürde; hidrojen peroksidin, diş pulpası kök hücresi (DPSC) üzerine genotoksik etkilerini komet analiz yöntemi ile inceleyen ilk araştırmadır.

Çalışmamızda 0. saatte kontrol baş uzunluğu ile 2HP grubu arasında anlamlı farklılık yokken diğer gruplar kontrolden anlamlı olarak düşüktür. Yirmi dördüncü. saatte tüm gruplarda baş uzunluğu açısından kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmedi. 48. saatte 6HP ve E2HP gruplarının baş uzunluğu kontrole göre anlamlı olarak düşüktür. 72. saatte kontrol ile 2HP ve 6HP grubu hariç diğer gruplar arasında anlamlı farklılıklar vardır.

Baş uzunluğu sağlam DNA'yı içeren baş çapını ifade eder. Çünkü hasarsız, süper halka DNA, elektrik akımının etkisi altındayken göç etmemektedir (Madhulika vd 2015). Baş uzunluğundaki azalma toksik hasarın göstergesi olarak kabul edilmektedir. Didenko (2006) ve Fidan (2009) tarafından DNA hasarı oluşmaya başlamış ise DNA zincir kırıklarına bağlı olarak hasar yokken düzgün kenarlı olan görüntünün, DNA kırıklarının çekirdek dışına göçü nedeniyle düzensiz bir hal aldığı ve merkezden kenara doğru uzama görüldüğünü ve bu uzamanın hasar ile doğru orantılı olduğu belirtilmiştir (Gündoğdu vd 2012). Çalışmamızın sonuçlarını değerlendirdiğimizde yüksek dozdaki HP'in baş uzunluğunu azalttığını ancak E vitamini ve CM'nin bunu düzeltmede etkisiz olduğu gözlemlendi. Ama bu parametre DNA hasarını gösteren çok güçlü bir parametre değildir. Literatürde baş uzunluğunun değerlendirildiği sınırlı çalışma bulunmaktadır. Birinde nöroblastoma hücre dizisinde homosistein ve sülfid uygulanan gruplarda baş uzunluğunun kontrole göre anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (Gündoğdu vd 2012). Diğer çalışmada ise etiolojisi bilinmeyen kronik enflamatuar hastalık olan oral liken planus (OLP) ile oral likenoid reaksiyondaki (OLR) genotoksitenin komet analizi ile değerlendirilmesi sonucu baş uzunluğunun sağlıklı olan kontrol grubuna göre anlamlı düştüğünü göstermiş. Bunun genotoksitenin sonucu olduğunu bildirmişlerdir (Madhulika vd 2015). Dolayısıyla bizim çalışmamızdaki baş uzunluğundaki azalma HP'in neden olduğu genotoksitenin sonucu olmuştur.

Baş yoğunluğu DNA hasarını göstermede kullanılan orta düzeyde bir parametredir ve başta bulunan sağlam DNA yüzdesini ifade eder. Baş yoğunluğu arttıkça DNA hasarı azalıyor demektir (Madhulika vd 2015). Çalışmamızda bunu değerlendirdiğimiz zaman grupların baş yoğunluğu sadece 48. saatte değişkenlik göstermekle beraber diğer tüm gruplarda kontrole göre anlamlı olarak azalmıştır. Literatürde baş yoğunluğundaki azalmaya yönelik çok fazla çalışma yoktur. Nöroblastoma üzerine yapılan bir çalışmada baş yoğunluğundaki azalmanın DNA hasarını ifade ettiği bildirilmiştir. Gündoğdu ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada baş uzunluğu ile uyumlu olarak baş yoğunluğunun da homosistein ve sülfid gruplarında kontrole göre anlamlı olarak azalırken ikisinin birlikteliğinin genotoksik etkiyi daha da arttırdığını bildirilmişlerdir (Gündoğdu vd 2012). Bir başka çalışmada oral liken planus (OLP) ile oral likenoid reaksiyondaki (OLR) genotoksisite comet analizi ile değerlendirildiğinde vaka gruplarının baş yoğunluğunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olmasından dolayı genotoksisitenin varlığından bahsedildiği çalışma da bizi destekler niteliktedir (Madhulika vd 2015).

Kuyruk uzunluğu, düşük seviyelerdeki DNA hasarına daha duyarlı bir komet parametresidir (Collins vd 2004, 2008). Kuyruk uzunluğundaki artış DNA hasarının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Ribeiro vd 2005, Collins vd 2004, 2008). Ancak kuyruk uzunluğu DNA hasarını belirlemede tek başına yeterli olmayıp bunun yanında kuyruk yoğunluğu da değerlendirilmelidir. Çünkü düşük seviyede DNA hasarı olduğunda kuyruk uzunluğu artarken sonrasında DNA hasarı arttıkça kuyruk uzunluğunda artış olmaz ancak kuyruk yoğunluğunda artış gözlenir. Ayrıca kuyruk uzunluğu görüntü ayarlarından etkilenmektedir (Collins 2004).

Bizim çalışmamızda da kuyruk uzunluğu 2HP ve 6HP gruplarında anlamlı olarak artmaktadır. Sadece 6HP'nin 48. saatinde anlamlı olarak düşmektedir. 2HP grubunda kontrole göre kuyruk uzunluğu artarken grubun kendi içerisinde anlamlı farklılık gözlenmemiştir. 6HP grubunda kendi içinde 24 ile 72. saatler arasındaki hariç diğer tüm zamanlar arasında kuyruk uzunluğu anlamlı farklılık göstermektedir. 2HP grubunda HP'in toksik etkisi sonucu DNA hasarı yaptığı yönündeki çalışmalar bizi destekler niteliktedir. HL-60 insan lösemi hücrelerine kurşun nitratın $Pb(NO_3)_2$ artan dozlar ile verilmesinin genotoksik etkisinin komet analizi ile değerlendirildiği çalışmada doz artışı ile beraber kuyruk uzunluğundaki ve kuyruk momentindeki anlamlı artışın genotoksisitedeki artışı gösterdiği bildirilmiştir (Yedjou vd 2015). Ancak 6HP grubunun 48. saatteki kuyruk uzunluğundaki azalmanın nedeni konusunda başka çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Kuboyama ve arkadaşlarının yaptığı çalışma bizim bu bulgumuza benzer niteliktedir. Şöyle ki; çalışmalarında fare embriyonik kök hücrelerine

300 µM HP uyguladıktan 48 ve 72 saat sonra HPLC-ECD (High Performance Liquid Chromatography coupled with Electrochemical Detection) ile DNA'daki nokta mutasyonunu ifade eden 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua) seviyesine bakmışlardır. Bu çalışmalarında HP uygulanan grupta 48 saatte kontrole göre DNA hasarının bir göstergesi olan 8-OH-Gua seviyesi anlamlı olmasa da HP uygulanmayan 0. saatteki kontrol grubundan düşük olduğunu göstermişlerdir (Kuboyama vd 2011). Ayrıca bu sonuç hücreye özgü olabilir. Şöyle ki diferansiye olmamış embriyonik kök hücreler, diferansiye olanlar ile karşılaştırıldığında; HP etkisiyle gelişen DNA hasarına karşı diferansiye olmamış kök hücrelerin daha dirençli oldukları bildirilmiştir (Hirano ve Tamae 2012, Kuboyama vd 2011, Vinoth vd 2015). Soares ve ark yapmış oldukları çalışmada, MDPC-23 ve HDPC hücreleri HP ile muamele edildikten sonra membran hasarı bakımından kıyaslamak amacıyla hasarlı hücrelerin DNA'sına bağlanan Eth-1 ile değerlendirildiğinde HDPC'deki membran hasarının MDPC 23'e göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (Soares vd 2014). Bu sonucun, yüksek konsantrasyon HP'in, hücrel koruyucu mekanizmaları düşük konsantrasyondakine göre daha hızlı faaliyete geçirip HP'in zararlı etkilerini daha çabuk bertaraf ettiği için ya da elimizdeki bilgiler ile açıklayamadığımız moleküler mekanizmalardan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Sonuçlarımız HP verilmesinin kuyruk uzunluğunda meydana getirdiği değişikliğin E vitamini ve CM verilmesiyle düzeltildiğini göstermektedir. Sadece HP verilen gruplarda kuyruk uzunluğu kontrole göre artmaktayken E vitamini ve CM verilmesi durumunda HP verilen gruplar ile kontrol arasındaki fark ortadan kalkmaktadır. E vitamini ve CM uygulanan grupların 0, 24, 72 saatte ölçülen kuyruk uzunluğu HP uygulanan gruplara göre anlamlı olarak azalmıştır, kontrolle benzerlik göstermektedir. Bu olumlu etkisi bazı saatlerde kontrole göre daha iyi olmuştur. E vitamini verilen gruplardaki bu olumlu etkinin nedeni α-Tokoferolün toksisiteyi azaltıcı etkisinden kaynaklanıyor olabilir (Vargas vd 2014). Tokoferoller, lipid peroksi radikaller hedef lipidlerden hidrojen koparmadan önce onlara bir hidrojen atomunu vererek; onların biyolojik sistemlere zarar vermesini engeller. E6HP ve CM6HP gruplarının 48 saat sonra ölçülen kuyruk uzunluğu ortalamaları beklenenin tersine 6HP'den anlamlı olarak fazladır. Yüksek konsantrasyondaki HP etkisiyle oluşan hasarın tamiri için dışardan verilen antioksidanların aksine süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi endojen tamir mekanizmaları devreye girdiği için 6HP grubu E6HP ve CM6HP'den daha az hasara neden olmuş olabilir. Ancak bu sadece bir spekülasyondan ibarettir. Çünkü literatürde böyle bir çalışma olmadığından sonuçlarımızı karşılaştırma şansına sahip değiliz. Ancak bir araştırmacı DNA hasarını değerlendirmek için kuyruk uzunluğundan ziyade kuyruktaki % DNA'yı ifade eden

kuyruk yoğunluğunu daha kıymetli bir parametre olarak kabul etmekteyken (Collins 2004) başka bir araştırmacı da kuyruk yoğunluğu ile kuyruk uzunluğunun formülasyonu ile elde edilen kuyruk momenti parametresinin değerlendirilmesinin daha sağlıklı sonuç vereceğini bildirmektedir (Ribeiro vd 2005).

Collins ve arkadaşlarına (2004, 2008) göre kuyruk yoğunluğu DNA kırıklarının frekansı ile doğrusal bir ilişki taşıdığı için en yararlı parametredir. Nispeten görüntü analiz programının arka plan ayarlarından etkilenmez ve teorik olarak %0'dan 100'e kadar olan geniş bir aralıkta DNA hasarını belirtir. Aynı zamanda komet şeklinin neye benzediğini çok açık net ifade eder. Bu nedenle kuyruk uzunluğuna ve kuyruk momentine göre daha iyi bir DNA hasar göstergesi olduğu kabul edilmektedir.

Çalışmamızda kuyruk yoğunluğu ortalamaları, 2HP ve 6HP gruplarında, ölçülen tüm zamanlarda kontrole göre anlamlı olarak artmakla beraber; hemen yapılan ölçümlerde 6HP grubunun ortalaması 2HP grubundan bile anlamlı olarak artmıştır. Bulgularımız literatür ile paralel olup HP'in genotoksik etkisi olduğunu ve bu etkinin doz artışıyla beraber arttığı gözlemlenmiştir (Ribeiro vd 2005, Ribeiro vd 2006). HDPC hücrelerinde, %35 HP'in pulpa hücrelerinde güçlü oksidatif stres sonucu yoğun hücre ölümüne sebep olurken %17,5 HP'nin pulpa hücrelerine sitotoksik etkisinin daha az olduğu bildirilmiştir (Soares vd 2014). Literatürde kuyruk yoğunluğunun önemi yeni kavranmakta ve genotoksisite çalışmalarında yeni yeni belirtilmektedir. Kandaki kurşun seviyesinin genotoksisiteye etkisinin komet analizi ile değerlendirildiği bir çalışmada kurşun seviyesi yüksek olan kanlardan izole edilen lenfositlerdeki kuyruk yoğunluğu istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Kayaaltı vd 2015). Bir başka çalışmada oral liken planus (OLP) ile oral likenoid reaksiyondaki (OLR) genotoksisite comet analizi ile değerlendirildiğinde vaka gruplarının kuyruk yoğunluğunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olmasından dolayı genotoksisitenin varlığından bahsedildiği çalışma da bizi destekler niteliktedir (Madhulika vd 2016). Bizim bulgularımıza göre de HP uygulanmasıyla beraber her iki dozda da artan kuyruk yoğunluğu genotoksisitenin varlığını ifade etmektedir.

2HP ile 6HP arasında 0. saat haricindeki zamanlarda doza bağlı olarak anlamlı fark göremedik. Vinoth ve arkadaşları da (2015) çalışmalarında embriyonik kök hücreye artan dozlar ile HP uyguladıklarında doz artışı ile kuyruk momentinde anlamlı artış gözlememişlerdir. Ancak 200 µM HP dozuna ulaştıklarında kuyruk momentinde anlamlı artış gözlemişlerdir. Bu da bizi destekler niteliktedir.

E2HP ve E6HP gruplarında kuyruk yoğunluğu kontrole göre artmıştır ancak sadece HP verilen gruplara göre kuyruk yoğunlukları azalmıştır. α-Tokoferol uygulanan gruplardaki kuyruk yoğunluğundaki azalmanın α-Tokoferolün, antienflamatuvar ve

antioksidan etkisi sayesinde olduğu düşünülmektedir (Atkinson vd 2008). Diyetinde düşük doz sebze ve meyve tüketme alışkanlığı olan sağlıklı bireylerde antioksidan (E vitamini de dahil) ve fitokimyasallar içeren multi besin takviyesinin, kandan izole edilen mononükleer hücrelerdeki etkilerinin komet analizi ile değerlendirildiği çalışmada kuyruk yoğunluğunun azaldığı bildirilmiştir (Kim vd 2013). E vitamini uygulanan gruplarda en düşük kuyruk yoğunluğu 48. saatte ölçülmüştür. Bu gruplarda zamanlar arasında farklıklar olmasına (Şekil 4.7) rağmen sadece HP uygulanan hücrelere göre daha düşük kuyruk yoğunluğunun gözlenmesi olumludur. Daha önce yapılan bir çalışmada α -Tokoferolün spesifik hücre tiplerinin membranları ile 24-27 saat gibi sürede birleştiği bildirilmiştir (Saito vd 2003). α -Tokoferolün 24 saatteki koruyuculuğunun hücre membranı ile etkileşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir (Vargas vd 2014).

CM2HP grubunun kuyruk yoğunluğu sadece 24. saatte 2HP grubuna göre anlamlı azalma gözlenmiştir diğer zamanlar açısından iki grup arasında anlamlılık bulunamamıştır. CM6HP grubunda ise 6HP'ye göre kuyruk yoğunluğu tüm zamanlarda anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. İlginç olarak CM uçucu yağının olumlu etkisini 2HP grubunda görmeye beraber 6HP grubunda daha iyi ortaya çıkmaktadır. Yüksek dozdaki HP ile muamele edilen DPSC'lerde süre geçtikçe kuyruk yoğunluğundaki azalmanın CM'nin hasar onarıcı etkisinin zamanla daha iyi ortaya çıktığını düşündürmektedir. Başka bir bitki olan *Rhus verniciflua* bitkisinden elde edilen buteinin değerlendirildiği bir çalışmada buteinin, JNK yolağı aracılığıyla düzenlenen HO-1 ekspresyonunu artırarak reaktif oksijen türleri üretimini ve sitotoksititeyi bloke ettiği ayrıca butein tedavisinin nükleer faktör-E2-ilişkili faktör 2 (Nrf2)'nin akümülyasyonunu sağladığı ve antioksidan cevap elementlerinin promoter aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (Lee vd 2013). Ancak bunun yanında başka bir çalışmada hücrelerin, HP ve onun ürünleri olan reaktif oksijen türleri (ROT) ile karşılaşması sonucu oksidatif hasar oluştuğu ve ayrıca ROT ile hücre içi antioksidanlar arasındaki dengesizlik sonucu ikincil bir oksidatif stres oluşabildiği bildirilmektedir (Cecarini vd 2007).

CM'nin DNA hasarını onardığını gösterir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Ashraf vd 2004 ve Ksouri vd 2007 tarafından CM'nin içeriğindeki yüksek antioksidan konsantrasyonu sayesinde reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu oksidatif hasara karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (Duros vd 2009, Lequeux vd 2011). Çalışmamızda da CM'nin antioksidan olarak ROT'lara karşı etkili olduğu düşünülmüştür. Fibroblastların ve keratinositlerin ekilmesi ile kültür ortamında oluşturulan deri modeli üzerine CM'den elde edilen hücrelerin etkilerinin incelendiği çalışmada rejenerasyon ve diferansiyasyonu artırıcı etkileri ve koruyucu fonksiyonları olan epidermisin yapısını

daha hızlı oluşturduğu CM hücrelerinin kullanılmadığı gruba göre anlamlı bulunmuştur (Lequeux vd 2011).

Komet analizinde, bilgisayarlı görüntüleme sistemlerinde hesaplanan parametreler içinde hem kuyruk uzunluğunu hem de kuyruktaki DNA oranını içinde bulundurması nedeniyle kuyruk momenti, DNA hasar seviyesini göstermesi bakımından en kullanışlı parametredir (Ribeiro vd 2005, Mincarelli vd 2016). Bunun aksi yöndeki görüş ise kuyruk momentinin doz ile doğrusal ilişkide olmamasına ve kometin görüntüsü hakkında herhangi bir izlenim vermemesine rağmen sadece popüler olduğunu bildirmiştir (Collins 2004). Buna dayanak olan başka bir çalışmada Vieira ve arkadaşları (2014) tarafından kuyruk momenti bulgularına göre genotoksisite gözlenmezken aynı çalışmada, kuyruk yoğunluğu bulgularına göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek hasar olduğu bildirilmiştir (Hermeto vd 2015).

Çalışmamızda sadece hidrojen peroksit uygulanan gruplarda tüm zamanlarda ölçülen kuyruk momenti kontrole göre anlamlı olarak artmıştır. Hatta hemen yapılan ölçümlerde 6HP grubunun kuyruk momentinin 2HP grubuna göre anlamlı olarak yüksektir bu iki grup arasında diğer zamanlar açısından anlamlı fark yoktur. Bu iki grup arasındaki farkın akut dönemde daha büyük ve anlamlı olması yüksek dozda akut dönemde hücrelerde daha hızlı hasar geliyor olabilir diye düşünülmüştür.

Dolayısıyla bulgularımız HP'in DNA hasarına sebep olduğunu ayrıca doz artışında da hasarın arttığını göstermektedir. L5178Y fare lenfoma hücrelerine (Ribeiro vd 2005) ve Chinese hamster ovaryum (CHO) hücrelerine (Ribeiro vd 2006) %16 ve %35 konsantrasyonlardaki HP'in etkisinin komet analizi ile değerlendirilmesi sonucunda yüksek doz (%35) HP uygulanan grupta kuyruk momenti düşük doz (%16) HP'e göre daha fazladır. Ribeiro ve arkadaşları da bizim çalışmadaki sadece HP uygulanan grupların 0. saat ölçüm sonuçlarımıza benzer şekilde diş beyazlatıcı ürünlerin konsantrasyonu arttıkça DNA kırıklarının da arttığı, düşük konsantrasyondaki beyazlatma ajanlarının kullanımı ile HP'in yan etkisinin azaldığını bildirmişlerdir (Ribeiro vd 2005). Ayrıca yine çalışmamızla paralel olarak; Fernández vd, hidrojen peroksit, karbamid peroksit, sodyum perkarbonat ve sodyum perboratın fare fibroblastlarına sitotoksik ve genotoksik etkisini değerlendirdiklerinde; toksisitenin dozla birlikte arttığını ve hidrojen peroksitin en sitotoksik ve genotoksik madde olduğunu bildirmişlerdir (Fernandez MR 2010). Hücre çekirdeğinde (nükleus) değişikliklere sebep olduğu bildirilmiştir (Goldberg vd 2010). Vinoth ve arkadaşları (2015), 50, 100 ve 200 µM konsantrasyondaki HP'in hem embriyonik kök hücreler hem de somatik hücreler üzerindeki etkilerini komet analizi ile değerlendirdiklerinde somatik hücrelerde doz artışı ile beraber kuyruk momentinin artarken embriyonik kök hücrelerde ise sadece

uygulanan en yüksek doz olan 200 µM HP'te kuyruk momentinin anlamlı olarak arttığını bildirmişlerdir.

E2HP ve E6HP gruplarında kuyruk momenti tüm zamanlarda anlamlı olmasa da kontrole göre yüksek bulunmuştur (E2HP 48. saat hariç). Ancak bu artış sadece HP verilen gruplardaki gibi yüksek değildir. E vitamini verilen gruplarda sadece HP uygulanan gruplara göre tüm zamanlarda anlamlı olmasa da kuyruk momentinin azaldığı gözlenmiştir. ROT arttıkça oksidatif stresin ortaya çıktığı ve hücrenin oksidatif molekülleri uzaklaştırarak hücre hasarını onarmaya çalıştığı bildirilmiştir (Squier TC 2001). Bu süreç sonunda okside-hasarlı moleküller ve disfonksiyonel makro moleküllerin ortaya çıktığını ve sonucunda hücresel homeostazi sağlamanın zorlaştığı bildirilmiştir (Cecarini vd 2007). ROT ile hücre membranlarındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin reaksiyona girmesi sonucu lipid peroksidasyonun başladığı, sonuçta membran hasarı ve hücre ölümü gerçekleştiği bildirilmiştir (Squier TC 2001). α-Tokoferolun membranın çoklu doymamış yağ asitleri ile etkileşip membran geçirgenliğini azaltarak zararlı olan lipid peroksidasyonun yayılımını engellediği bildirilmiştir (Azzi A. 2007). Astrositler, plasental hücreler, fibroblastlar ve hepatositler üzerinde yapılan daha önceki çalışmalarda HP'in indüklediği oksidatif strese karşı α-Tokoferolun, bir tane elektronunu serbest radikallere vererek serbest radikallerin stabil hale gelmesini sağlayıp oksidatif stres yayılımının durduğu bildirilmiştir (Makpol 2010, Yurdakul 2010). α-Tokoferolün, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz gibi endojen antioksidanların ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Tahan 2011, Guney vd 2011, Yılmaz 2012).

Aynı zamanda CM ve HP birlikte verildiği gruplarda kuyruk momenti kontrole göre tüm zamanlarda anlamlı olmasa da artış olduğu görülmektedir. E vitamini verilen gruplarda olduğu gibi CM verilen hücrelerde sadece HP uygulanan gruplara göre tüm zamanlarda anlamlı olmasa da kuyruk momentinde azalma görülmüştür. CM verilmesinin HP'in yol açtığı DNA hasarını azaltma yönünde etki gösterdiğini söyleyebiliriz. CM ile yapılan genotoksisite çalışmaları olmasa da yapılan diğer çalışmalarda Amor ve arkadaşları (2005) tarafından CM'nin, içeriğinde yüksek oranda bulunan flavonoidler, karotenoidler, C vitamini, antimikrobiyal maddelere ilaveten Heim ve arkadaşları tarafından (2002) fenolik bileşiklerden olan klorojenik asit sayesinde antioksidan özelliğinin fazla olduğu bildirilmiştir. Balasundram ve arkadaşları tarafından (2006) serbest radikalleri temizlediği ve reaktif oksijen türlerine karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızda da bazıları anlamlı olmakla beraber tüm zamanlarda E vitamini ve CM uygulanan gruplarda kuyruk momenti ortalaması sadece HP

uygulananlara göre azalmıştır. Sonuçta E vitamini ve CM uygulamanın DNA hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğu düşünülmektedir.

Kuyruk migrasyonu değerlendirildiğinde en yüksek artış 6HP grubunun 0. saatinde görülmüş olup bu artış tüm gruplara göre anlamlıdır. Ayrıca 0. saatte tüm grupların ortalamaları kontrole göre anlamlı olarak yüksektir. Sadece HP uygulanan 6HP grubunun tüm zamanlardaki kuyruk migrasyonu değerleri kontrole göre anlamlı olarak yüksek, 2HP grubunun da yüksek olup sadece 72. saatte anlamlı olmadığı diğer tüm zamanlarda anlamlı olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda HP etkisiyle görülen kuyruk migrasyonundaki artış, HP'in DPSC'ye genotoksik olduğunu göstermektedir.

Antioksidan uygulanan gruplarda 0. saat haricinde kuyruk migrasyonu ya kontrole yakın değerde ya da kontrolden anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Sonuçlarımız genel olarak E vit ve CM'nin genotoksisiteyi azaltıcı yöndeki etkisini göstermektedir. Bizim bulgularımız literatürle paralellik göstermektedir. Fibroblastların ve keratinositlerin ekilmesi ile kültür ortamında oluşturulan "deri modeli" üzerine CM'den elde edilen hücrelerin etkilerinin incelendiği çalışmada rejenerasyon ve diferansiyasyonu arttırıcı etkileri ve koruyucu fonksiyonları olan epidermisin yapısını daha hızlı oluşturduğu CM hücrelerinin kullanılmadığı gruba göre anlamlı bulunmuştur (Lequeux vd 2011). Silveira Vargas ve arkadaşlarının çalışmasının bulguları da bizimki ile örtüşmektedir. MDPC 23 hücrelerine sadece HP solüsyonunu 30 dakika uygulayıp ve ayrıca HP uygulanmadan öncesinde farklı konsantrasyonlarda ve farklı süreler ile α -Tokoferol uygulayıp hücre canlılığını değerlendirdiklerinde α -Tokoferol uygulanan gruplarda hücre canlılığının arttığını bildirmişlerdir. İlaveten kısa süre (1, 4, 8 saat) yüksek konsantrasyonda α -Tokoferol (3, 5, 10 mM) uygulanması ile uzun süre (24 saat) düşük konsantrasyonda α -Tokoferol (1, 3 mM) uygulanmasının hücre canlılığını arttırdığı bildirilmiştir (Vargas vd 2014). Önceki çalışmalarda yapılan fosfolipit hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PH-GPx) enzim aktivitesi analizleri sonuçlarına göre α -Tokoferolün hücre membranı ile 24-27 saat gibi sürede etkileştiği bildirilmiştir (Saito vd 2003). α -Tokoferolün 24 saatteki koruyuculuğunun hücre membranı ile etkileşiminden kaynaklandığı; 1, 4, 8 saat gibi kısa sürelerdeki koruyuculuğunun yüksek konsantrasyona bağlı olarak ekstra sellüler aktivitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Vargas vd 2014). Diş beyazlatmadan sonra hastaların en çok yakındığı husus olan diş hassasiyeti üzerine α -Tokoferolün olumlu etkileri bildirilmiştir. α -Tokoferolün vital diş beyazlatma sonrası görülen diş hassasiyetini önleyici, antienflamatuvar ve antioksidan etkisi olduğu bildirilmiştir (Atkinson vd 2008).

Çalışmamızda hidrojen peroksidin oksidan etkisi, E vitamininin ve *Crithmum maritimum* bitkisinin uçucu yağının antioksidan etkisini değerlendirmek amacıyla bu gruplarda total oksidan seviyeleri ve total antioksidan seviyelerine baktık.

Çalışmamızda hiçbir grubun TOS, TAS ve OSİ değerleri arasında anlamlı fark görülmemiştir. Beklentimiz HP düzeylerinin TOS'u arttıracığı yönüdeyken ancak bulgularımız bu yönde değildir. Bunun bir nedeni de hücrelerimizin kök hücre olması olabilir. Kök hücre dirençli olduğu için ölçebileceğimiz düzeyde TOS artmamış olabilir. Buna ilaveten hücrelerin oksidatif strese hassasiyeti hücre tipine özgüdür ve neden böyle olduğu hala anlaşılabilmiş değildir. Kimi hücreler okside molekülleri kaldırır, kimisi onarır, kimisi de değiştirir. Mesela HP etkisi ile isositrat dehidrat dehidrogenazın, domuz mitokondrisinde azaldığı; sinir terminallerinde ve kardiyak mitokondride değişmediği gözlenmiştir (Cecarini vd 2007).

Vinoth vd 2008, 2009 tarafından diferansiye olmamış insan embriyonik kök hücrelerinin (hESC), hem oksidatif hem de genotoksik strese karşı somatik hücrelere göre daha dirençli olduğu bildirilmiştir (Vinoth vd 2015). Ayrıca Kuboyama ve arkadaşları (2011) tarafından diferansiye olmamış fare embriyonik kök hücrelerin, ROT tarafından indüklenen DNA hasarına karşı diferansiye olanlarına göre daha dirençli oldukları bildirilen çalışma da yukarıdaki bulguları desteklemektedir. Bunun sebebinin embriyonik kök hücrelerin (hESC) somatik hücreler ile kıyaslandığında doğuştan, en düşük hücre içi bazal hidrojen peroksit ve süperoksit seviyesine sahip olması nedeniyle olabileceği düşünülmüştür (Vinoth vd 2015).

Komet analizi sonucu gözlenen hasarın TOS'da görülmemesinin sebebi oksidan hasar değil de HP'in başka mekanizmalar ile DNA hasarı yapmış olmasından dolayı olabilir. Mesela mitokondriyi etkilemesi ile mitokondrinin hasar görüp fonksiyon yapamaması sonucu veya hücrel kalsiyum miktarı artışına bağlı olarak enzim aktivasyonlarının (endonükleaz gibi) artışı sonucu veya membran hasarı sonucu veya proteinlerin hatalı katlanması sonucu DNA hasarı yapmış olabilir (Kumar vd 2013). Bu durum ayrıca n sayısının azlığından veya çalışmamızda uygulanan dozlardan kaynaklanabilir.

Beklentimiz uygulanan antioksidanların TAS düzeylerini arttıracığı yönüdeyken bulgularımız bu yönde değildir. Literatürde α -Tokoferolün, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz gibi endojen antioksidanların ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Guney vd 2011, Tahan 2011, Yilmaz 2012). Squier ve arkadaşları, hücrelerin oksidatif stresi yenebilmek için süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ürettiği ve oksidatif strese karşı koruyucu rol oynayan C ve E vitaminlerinin, organizmaya spesifik savunma mekanizmaları geliştirmesinde yardımcı olduğu bildirilmiştir (Squier vd 2001). Bizim sonuçlarımızın literatürle paralellik göstermemesinin nedeni uygulanan doza, hücre tipine bağlı olabilir.

Liu vd (2007) tarafından mitojen tarafından aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolağının, çeşitli hücre dışı uyarılara karşı hücrel yanıtı koordine ettiği ve çoğalma,

strese karşı cevap, apoptoz, ve bağışıklık gibi hücresel süreçlerde önemli rol oynadıkları bildirilmiştir. Iles ve arkadaşlarının bildirdiğine göre (2005) MAPK aktivasyonu, aynı zamanda HO-1 de dahil olmak üzere pek çok gen ve proteinlerin ekspresyonunu düzenler. Liu ve arkadaşlarına göre (2007) MAPK 'ler, çeşitli hücre dışı uyaranlara yanıt olarak aktive olan ve hücre yüzeyinden çekirdeğe doğru olan sinyalin iletimine aracılık eden bir grup serin/treonin protein kinazlardır. MAPK ailesinin ERK1/2, JNK ve p38 MAPK olmak üzere üç büyük alt grubu tespit edilmiştir Elbert ve arkadaşları (1998) MAPK yollarının HO-1 gen ekspresyonunu düzenleyici rol oynadığını bildirmiştir. Bir çalışmada hidrojen peroksite indüklediği hücre ölümüne karşı *Rhus verniciflua* bitkisinden elde edilen buteinin, JNK yolağı aracılığıyla düzenlenen HO-1 ekspresyonunu artırarak reaktif oksijen türleri üretimini ve sitotoksiteyi bloke ettiği bildirilmiştir. Ayrıca butein tedavisinin nükleer faktör-E2-ilişkili faktör 2 (Nrf2)'nin akümüülasyonunu sağladığı ve antioksidan cevap elementlerinin promoter aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (Lee vd 2013).

Min ve arkadaşları (2008) HDPC'de, oksidatif strese karşı pulpa hücrelerini koruyan hem oksijenaz-1 (HO-1)'in, hidrojen peroksit varlığında ekspresyonunun arttığını ve ayrıca HO-1 yolağı ile bağlantılı olarak Dentin Sialofosfoprotein (DSPP) ekspresyonunun da arttığını gösterdiler. Lee YH ve arkadaşları (2013) tarafından, yakın zamanda tanımlanan çekirdek reseptör süper ailesinin üyesi olan peroksizom proliferatör-aktive reseptör gamanın (PPARg) da hidrojen peroksite karşı HDPC'de sitoprotektif etkisi olduğu bildirildi. HDPC'ye toksik dozda hidrojen peroksit uygulandığında PPARg ekspresyonunun artmasıyla dentin mineralizasyonunda artış bildirilmiştir. Bunun sonucunda HO-1 ve PPARg'ın, oksidatif strese karşı insan pulpa hücrelerinde dentinogenezisin devamlılığında rol oynadığı bildirilmiştir (Soares vd 2015). HDPC lerde in vitro uzun süre HP'e maruziyetten sonra görülen yoğun oksidatif stres sonucu DSPP ve DMP-1'in mRNA ekspresyonunun azaldığı ve sonucunda mineralize matriks depozisyonunun bozulduğu bildirilmiştir (Lee YH vd 2013). Tam aksine; Min (2008), Matsui ve arkadaşları (2009) tarafından HDPC hücrelerinde odontoblast markırlarının aktivitesi ve ekspresyonunun, düşük konsantrasyondaki HP'de arttığı bildirilmiştir. Toksik olmayan konsantrasyonlarda HP ile maruziyet sonucu ALP aktivitesinde ve DSPP, OPN (osteopontin) ve OCN (osteocalcin) ekspresyonunda artış sonucu kalsifiye nodül depozisyonunda artış bildirilmiştir (Soares vd 2013).

Diş beyazlatma sırasında uygulanan hidrojen peroksit sonucu DPSC'de enflamatuar yanıtın oluşup oluşmadığını ve enflamatuar yanıt varsa antioksidanların etkilerini gözlemlemek amacıyla TNF α ve IL-6 düzeyleri incelenmiştir. Gruplar ve değişik zamanlardaki düzeyleri değerlendirildiğinde TNF α ve IL-6 seviyeleri değişiklik göstermekle beraber aralarında bu parametreler açısından anlamlı fark gözlenmemiştir.

Wu vd, toksik konsantrasyondaki HP'in nekroz ve apoptoza kaspaz-9 yolağı ile neden olup hücre canlılığını azalttığını bildirmişlerdir (Wu vd 2013). Cooper ve arkadaşları tarafından (2014) HP etkisi ile hücrelerin ölmesi sonucu in vivo olarak yoğun hasar gözleendiği ve lizozomal enzimler gibi hücrenel komponentlerde artış, komşu hücrelerde hasar, antienflamatuvar doku reaksiyonlarının tetiklendiği bildirilmiştir. İnsan ve sıçanlarda, %35 gibi yüksek konsantrasyonlardaki HP ile yapılan in vivo çalışmalarda pulpal enflamasyonla ilişkili lokal doku nekrozu gösterildi (Costa vd 2010, Cintra vd 2014). Diş beyazlatıcıların neden olduğu oksidatif stres sonucu gözlenen pulpal enflamasyon, beyazlatıcının konsantrasyonu ve uygulama süresi arttıkça artar, mine dentin kalınlığı arttıkça azalır (Costa vd 2010). HDPC hücrelerinde, %35 HP ile 45 dk beyazlatma, hızlı ve etkili beyazlatma sağladığı gibi pulpa hücrelerinde güçlü oksidatif stres sonucu yoğun hücre ölümüne sebep olmaktadır. %35 HP ile 5 dk'lık beyazlatma ya da düşük konsantrasyondaki %17,5 HP'yi 45, 15, 5 dk'lık sürelerde uygulamanın kademeli beyazlatma sağladığı gibi pulpa hücrelerine sitotoksiteyi azalttığı bildirilmiştir (Soares vd 2014). %17,5 konsantrasyonda HP uygulanan HDPC'de, HP uygulanmayan kontrol hücrelerine oranla, IL-6, TNF-a, COX-2, ve IL-1b ekspresyonunda artış bildirildi. Sousa (2014), Jeong (2010), Ohkura ve arkadaşları tarafından (2014) COX-2 geni tarafından sentezlenen proenflamatuvar medyatörlerden Prostaglandin E2, pulpa dokusunda enflamasyonu ve hasarı hızlandırdığı bildirilmiştir. Roderjan (2014), Horst (2011), Kim (2013), Asgary (2014), Diomedea ve arkadaşları (2014) pulpa, bakteri ve dental materyaller ile karşılaşınca bağışıklık sistemi hücreleri ve pulpa dokusunun yapısal hücreleri olan odontoblastlar, fibroblastlar, mezenşimal kök hücreleri tarafından IL-1a, IL-1b, TNF-a, IL-4, IL-6, IL-8, and IL-10 salgılandığı bildirilmiştir. Yazid (2014), Durutürk ve arkadaşları (2013), bu moleküllerin lenfositler, makrofajlar, nötrofiller için düzenleyici olup enflamatuvar reaksiyonları aktive ettiklerini bildirmişlerdir. Bu reaksiyonlar sonucunda metalloproteinazlar gibi proteolitik enzimler salgılanması ile ekstra sellüler matriks bileşenlerinin bozulduğu bildirilmiştir (Cooper 2010, Sato 2013, Soares vd 2015). İn vivo olarak yapılan bir çalışmada genç insan premolar dişlerine %35 HP uygulanmasıyla protein matriksin bozulmasında rol oynayan metalloproteinaz ve sistein katepsin B aktivitelerinin arttığı bildirilmiş (Sato vd 2013). Spoto (2001), Min (2006), Silva (2009), Alongi (2010), Wu (2013), Diomedea ve arkadaşları tarafından (2014) enflamatuvar sitokinlerin pulpada dejeneratif ya da rejeneratif olmasının konsantrasyonlarına bağlı olduğu bildirilmiştir (Soares vd 2015). Enflamatuvar sitokinlerin (medyatörler) dozu ve temas süresi ile odontoblastik diferansiyasyon arasında ince denge olduğunu bildirmişlerdir (Cooper vd 2014).

Zhu ve arkadaşları (2012), HP'nin sitotoksik etkilerinin hücre tipine göre farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. 0,5mmol/L HP'nin, primer hücre kültüründe, insan gingival

fibroblastlarının (HGF) ve L929 fare fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerinde etkisi olmadığını ancak HDPC ve MC3TC-E1 preosteoblast hücrelerinin canlılığını %100 azalttığını göstermişlerdir. Min ve arkadaşları (2008), 0,5mM HP ile 1 saat muamele edilen HDPC hücrelerinin canlılığında %65 azalma olduğunu bildirmişlerdir. Aynı konsantrasyondaki HP ile 24 saat muamele edilen MDPC-23 hücrelerinin canlılığında %35 azalma olduğu bildirilmiştir (Lee vd 2006). %35 HP konsantrasyonu olan diş beyazlatıcı ajanların 1 saat uygulanması ile mine dentini aşarak MDPC 23 hücrelerinin canlılığında %50-60 oranında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Soares vd 2014). Çalışmamızda DPSC'ye 2 µg/ml HP uygulanması sonucunda XTT ile hücre canlılığı değerlendirildiğinde uygulamadan 24 saat sonra hücrelerin yaklaşık %73'ü, 48 saat sonra %52'si ve 72 saat sonra %90'ı canlılıklarını korumaktaydı. 6 µg/ml HP uygulanması sonucunda XTT ile hücre canlılığı değerlendirildiğinde uygulamadan 24 saat sonra hücrelerin yaklaşık %65'i, 48 saat sonra %49'u ve 72 saat sonra %78'i canlıydı. Bulgularımız literatür ile paralel olarak doz artışı ile birlikte hücre canlılığının azaldığını hatta HP'e maruziyet süresi arttıkça da hücre canlılığının azaldığını göstermektedir. Dikkat çeken nokta ise hem 2 µg/ml hem de 6 µg/ml uygulanan gruplarda 72 saat sonra gözlenen hücre canlılığındaki artıştır. Elde edilen bu sonuca göre 72. saatte hücrelerin tamir mekanizması etkisini gösterip hücre canlılığında artışa neden olmuş olabilir. Bu konunun aydınlatılması için daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

6. SONUÇLAR

1. Çalışmamızın sonuçlarını değerlendirdiğimizde baş uzunluğundaki azalma yüksek dozdaki HP'in neden olduğu genotoksisite sonucu olmuştur. Ancak E vitamini ve CM'nin bunu düzeltmede katkı sağladığını söyleyemeyiz.
2. Grupların baş yoğunluğu sadece 48. saatte değişkenlik göstermekle beraber diğer tüm gruplarda kontrole göre anlamlı olarak azalmıştır.
3. Çalışmamızda kuyruk uzunluğu HP'in genotoksik etkisi sonucu 2HP ve 6HP gruplarında anlamlı olarak artmaktadır. Sadece 6HP'nin 48. saatinde anlamlı olarak düşmektedir. Ancak 6HP grubunun 48. saatteki kuyruk uzunluğundaki azalmanın nedeni konusunda başka çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.
4. E vitamini ve CM uygulanan grupların 0, 24, 72 saatte ölçülen kuyruk uzunluğu HP uygulanan gruplara göre anlamlı olarak azalmıştır, kontrole benzerlik göstermektedir. Bu olumlu etkisi bazı saatlerde kontrole göre daha iyi olmuştur. E6HP ve CM6HP gruplarının 48 saat sonra ölçülen kuyruk uzunluğu ortalamaları beklenenin tersine 6HP'den anlamlı olarak fazladır.
5. Çalışmamızda kuyruk yoğunluğu ortalamaları, 2HP ve 6HP gruplarında, ölçülen tüm zamanlarda kontrole göre anlamlı olarak artmakla beraber; hemen yapılan ölçümlerde 6HP grubunun ortalaması 2HP grubundan bile anlamlı olarak artmıştır. Bulgularımız literatür ile paralel olup HP'in genotoksik etkisi olduğunu ve bu etki hemen değerlendirildiğinde doz artışıyla beraber arttığı gözlemlenmiştir.
6. E vitamini gruplarında kuyruk yoğunluğu kontrole göre artmıştır ancak sadece HP verilen gruplara göre kuyruk yoğunlukları azalmıştır. E vitamininin genotoksisite üzerindeki baskılayıcı etkisi gösterilmiştir.
7. CM uçucu yağının olumlu etkisini 2HP grubunda görmekle beraber 6HP grubunda daha iyi ortaya çıkmaktadır. Yüksek dozdaki HP ile muamele edilen DPSC'lerde süre geçtikçe kuyruk yoğunluğundaki azalmanın CM'nin hasar onarıcı etkisinin zamanla daha iyi ortaya çıktığını düşündürmektedir. Bunun aydınlatılması için ileri çalışmalara gereksinim vardır.

8. Çalışmamızda sadece hidrojen peroksit uygulanan gruplarda tüm zamanlarda ölçülen kuyruk momenti kontrole göre anlamlı olarak artmıştır. Hatta hemen yapılan ölçümlerde 6HP grubunun kuyruk momentinin 2HP grubuna göre anlamlı olarak yüksektir bu da literatür ile paralel olup diğ beyazlatıcı ürünlerin konsantrasyonu arttıkça DNA kırıklarının da arttığı gösterilmiştir. Bu iki grup arasında diğ zamanlar açısından anlamlı fark yoktur. Bu iki grup arasındaki farkın akut dönemde daha büyük ve anlamlı olması yüksek dozda akut dönemde hücrelerde daha hızlı hasar geliyor olabilir diye düşünöldü.
9. Çalışmamızda bazıları anlamlı olmakla beraber tüm zamanlarda E vitamini ve CM uygulanan gruplarda kuyruk momenti ortalaması sadece HP uygulananlara göre azalmıştır. Sonuçta E vitamini ve CM uygulamanın DNA hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğı düşünöldü.
10. Çalışmamızda HP etkisiyle görölen kuyruk migrasyonundaki artış, HP'in DPSC'ye genotoksik olduğunu göstermektedir.
11. Genel olarak kuyruk migrasyonundaki azalma E vitamini ve CM'nin genotoksisiteyi azaltıcı yöndeki etkisini göstermektedir. Bizim bulgularımız literatürle paralellik göstermektedir.
12. Çalışmamızda hiçbir grubun TOS, TAS ve OSI değerleri arasında anlamlı fark görölmemiştir. Beklentimiz HP düzeylerinin TOS'u arttıracığı yöndeyken ancak bulgularımız bu yönde değildir. Bunun bir nedeni kök hücrenin dirençli olmasından dolayı TOS ölçebileceğimiz düzeyde artmamış olabilir. Bunun aydınlatılması için ileri çalışmalara gereksinim vardır.
13. Beklentimiz uygulanan antioksidanların TAS düzeylerini arttıracığı yönündeyken bulgularımız bu yönde değildir. Bu durum daha ileri çalışmalar ile açıklığa kavuşturulabilir.
14. Gruplar ve değişik zamanlardaki düzeyleri değerlendirildiğinde TNF α ve IL-6 seviyeleri değişkenlik göstermekle beraber aralarında bu parametreler açısından anlamlı fark gözlenmemiştir.
15. XTT ile hücre canlılığı değerlendirildiğinde uygulamadan 24 saat sonra hücrelerin yaklaşık %65'i, 48 saat sonra %49'u ve 72 saat sonra %78'i canlıydı. Dikkat çeken nokta ise 72 saat sonra gözlenen hücre canlılığındaki artıştır. Bu konunun aydınlatılması için daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Sonuç olarak çalışmamız diş beyazlatıcı olarak kullanılan HP'in hücrelere zarar verdiğini DNA hasarına yol açtığını, E vit ve CM bitkisinin bu hasarı azalttığını göstermektedir. Bu olayların mekanizmaları çok açık olmasa da diş beyazlatıcıların kullanılmasında dikkatli olunması gerektiğini sonuçlarımız vurgulamaktadır.



7. KAYNAKLAR

Ablal MA, Adeyemi AA, Jarad FD. The whitening effect of chlorine dioxide-an in vitro study. *J Dent* 2013; 41(5): 76-81.

Aggarwal BB, Sundaram C, Prasad S, Kannappan R. Tocotrienols, the vitamin E of the 21st century: its potential against cancer and other chronic diseases. *Biochem Pharmacol* 2010; 80(11): 1613-1631.

Akal N, Over H, Olmez A, Bodur H. Effects of carbamide peroxide containing bleaching agents on the morphology and subsurface hardness of enamel. *J Clin Pediatr Dent* 2001; 25: 293-6.

Albers H. Lightening natural teeth. *ADEPT Rep* 1991; 2: 1-24.

Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(3): 463-99.

Almeida AF, Torre Edo N, Selayaran Mdos S, Leite FR, Demarco FF, Loguercio AD, Etges A. Genotoxic potential of 10% and 16% carbamide peroxide in dental bleaching. *Braz Oral Res* 2015; (29)1: 1-7.

Alongi DJ, Yamaza T, Song Y, Fouad AF, Romberg EE, Shi S, Tuan RS, Huang GTJ. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regen Med* 2010; 5(4): 617-631.

Al-Salmani K, Abbas HH, Schulpen S, Karbaschi M, Abdalla I, Bowman KJ, So KK, Evans MD, Jones GD, Godschalk RW, Cooke MS. Simplified method for the collection, storage, and comet assay analysis of DNA damage in whole blood. *Free Radic Biol Med* 2011; 51(3): 719-25.

Amor NB, Hamed KB, Debez A, Grignon C, Abdelly C, Physiological and antioxidant responses of the perennial halophyte *Crithmum maritimum* to salinity. *Plant Sci* 2005; 168: 889–899.

Anderson DG, Chiego DJ Jr, Glickman GN, McCauley LK. A clinical assessment of the effects of 10% carbamide peroxide gel on human pulp tissue. *J Endod* 1999; 25(4): 247-50.

Araldi RP, Melo TC, Diniz N, Mazzuchelli-de-Souza J, Carvalho RF, Beçak W, Stocco RC. Bovine papillomavirus clastogenic effect analyzed in comet assay. *Biomed Res Int* 2013; (2013): 1-7.

Araldi RP, Rechiutti BM, Mendes TB, Ito ET, Souza EB. Mutagenic potential of *Cordia ecalyculata* alone and in association with *Spirulina maxima* for their evaluation as candidate anti-obesity drugs. *Genet Mol Res* 2014; 13(3): 5207-20.

Araldi RP, Thatiana CM, Thais BM, Luiz PSJ, Nozima BHN, Tiemi EI, Carvalho RF,

Souza EB, Stocco RC. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomed Pharmacother** 2015; 72: 74-82.

Arends J, Jongebloed WL, Goldberg M, Schuthof J. Interaction of urea and human enamel. **Caries Res** 1984; 18(1): 17-24.

Armênio RV, Fitarelli F, Armênio MF, Demarco FF, Reis A, Loguercio AD. The effect of fluoride gel use on bleaching sensitivity: a double-blind randomized controlled clinical trial. **J Am Dent Assoc** 2008; 139(5): 592-7.

Asad NR, Leitao AC. Effects of metal ion chelators on DNA strand breaks and inactivation by hydrogen peroxide in *Escherichia coli*: detection of iron-dependent lesions. **J Bacteriol** 1991; 173(8): 2562–2568.

Asgary S, Nazarian H, Khojasteh A, Shokouhinejad N. Gene expression and cytokine release during odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by 2 endodontic biomaterials. **J Endod** 2014; 40(3): 387–392.

Ashraf M, Harris PJC. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants, **Plant Sci** 2004; 166: 3-16.

Atkinson J, Epand RF, Epand RM. Tocopherols and tocotrienols in membranes: a critical review. **Free Radic Biol Med** 2008; 44(5): 739-764.

Attin T, Paqué F, Ajam F, Lennon AM. Review of the current status of tooth whitening with the walking bleach technique. **Int Endod J** 2003; 36(5): 313-29.

Attin T, Muller T, Patyk A, Lennon AM. Influence of different bleaching systems on fracture toughness and hardness of enamel. **Oper Dent** 2004; 29: 188-95.

Azqueta A, Collins AR. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Arch Toxicol** 2013; 87(6): 949-68.

Azzi A. Molecular mechanism of alpha-tocopherol action. **Free Radic Biol Med** 2007; 43(1): 16-21.

Basting RT, Rodrigues AL, Serra MC. The effect of 10% carbamide peroxide, carbopol and/or glycerin on enamel and dentin microhardness. **Oper Dent** 2005; 30: 608-16.

Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chem** 2006; 99: 191-203.

Benetti AR, Valera MC, Mancini MN, Miranda CB, Balducci I. In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber. **Int Endod J** 2004; 37(2): 120-4.

Beutler B, Cerami A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. **N Engl J Med** 1987; 316(7): 379-85.

Bonafé E, Bacovis CL, Iensen S, Loguercio AD, Reis A, Kossatz S. Tooth sensitivity and efficacy of in-office bleaching in restored teeth. **J Dent** 2013; 41(4): 363-9.

Borges AB, Torres CR, de Souza PA, Caneppele TM, Santos LF, Magalhães AC. Bleaching gels containing calcium and fluoride: effect on enamel erosion susceptibility. **Int J Dent** 2012; 2012: 6 sayfa.

Boushell LW, Ritter A, Garland GE, Tiwana KK, Smith LR, Broome A, Leonard RH. Nightguard Vital Bleaching: Side Effects and Patient Satisfaction 10 to 17 Years Post-Treatment. *J Esthet Restor Dent* 2012; 24(3): 211–219.

Bowles WH, Ugwuneri Z. Pulp chamber penetration by hydrogen peroxide following vital bleaching procedures. *J Endod* 1987; 13(8): 375-7.

Bowles WH, Burns H. Catalase/peroxidase activity in dental pulp. *J Endod* 1992; 18(11): 527-534.

Brackett MG, Lewis JB, Messer RL, Lei L, Lockwood PE, Wataha JC. Dysregulation of monocytic cytokine secretion by endodontic sealers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2011; 97(1): 49-57.

Brambilla G, Martelli A. Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals. *Mutat Res* 2009; 681(2-3): 209-29.

Brotherton Boron BJ. Inorganic chemistry encyclopedia of inorganic chemistry. Bruce King: *John Wiley & Sons*, 1994.

Bruzell EM, Pallesen U, Thoresen NR, Wallman C, Dahl JE. Side effects of external tooth bleaching: a multi-centre practice-based prospective study. *Br Dent J* 2013 Nov 8; 215(9):E17.

Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, Escobar P, Honma M, Kumaravel TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaud V, Uno Y, Vasquez M, Hartmann A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup, *Mutat Res* 2007; 627(1): 31–35,

Camargo SE, Valera MC, Camargo CH, Gasparoto Mancini MN, Menezes MM. Penetration of 38% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine and human teeth submitted to office bleach technique. *J Endod* 2007; 33(9): 1074-7.

Camargo SE, Cardoso PE, Valera MC, de Araújo MA, Kojima AN. Penetration of 35% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine teeth after LED or Nd: YAG laser activation. *Eur J Esthet Dent* 2009; 4(1): 82-8.

Camps J, de Franceschi H, Idir F, Roland C, About I. Time-course diffusion of hydrogen peroxide through human dentin: clinical significance for young tooth internal bleaching. *J Endod* 2007; 33: 455–9.

Caviedes-Bucheli J, Ariza-Garcia G, Restrepo-Mendez S, Ríos-Osorio N, Lombana N, Muñoz HR. The effect of tooth bleaching on substance P expression in human dental pulp. *J Endod* 2008; 34: 1462-1465.

Cecarini V, Gee J, Fioretti E, Amici M, Angeletti M, Eleuteri AM, Keller JN. Protein oxidation and cellular homeostasis: emphasis on metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773(2): 93-104.

Cesar ICR, Redigolo ML, Liporoni PCS, Munin E. Analysis by photoreflectance spectroscopy and vickers hardness of conventional and laser-assisted tooth bleaching. *Am J Dent* 2005; 18: 219–22.

Chehimi J, Starr SE, Frank I, D'Andrea A, Ma X, MacGregor RR, Sennelier J, Trinchieri G. Impaired interleukin 12 production in human immunodeficiency virus-infected

patients. *J Exp Med* 1994; 179(4): 1361-6.

Chng HK, Ramli HN, Yap AUJ, Lim CT. Effect of hydrogen peroxide on intertubular dentine. *Journal of Dentistry* 2005; 33: 363-9

Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *J Periodontal Res* 2006; 41(6): 547-53.

Cintra LT, Benetti F, da Silva Facundo AC, Ferreira LL, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Rahal V, Briso AL. The number of bleaching sessions influences pulp tissue damage in rat teeth. *J Endod* 2013; 39(12): 1576-1580.

Cintra LT, Benetti F, Ferreira LL, Rahal V, Ervolino E, Jacinto Rde C, Gomes Filho JE, Briso AL. Evaluation of an experimental rat model for comparative studies of bleaching agents. *J Appl Oral Sci* 2016; 24(2): 171-80.

Cobankara FK, Unlu N, Altinoz HC, Fusun O. Effect of home bleaching agents on the roughness and surface morphology of human enamel and dentine. *Int Dent J* 2004; 54: 211-8.

Coldebella CR, Ribeiro APD, Sacono NT, Trindade FZ, Hebling J, Costa CAS, Preto R. Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on cultured odontoblast-like cells. *Br Dent J* 2009; 20(4): 267-274.

Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004; 26(3): 249-61.

Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaiva I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Sitetina R. The Comet Assay: Topical Issues. *Mutagenesis* 2008; 23(3): 143-151.

Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent* 2010; 38(9): 687-697.

Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. *J Endod* 2014; 40(4): 46-51.

Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109(4): 59-64.

Cotran RS, Kumar V, Robbins CV. Patologia Estrutural e Funcional, **W.B. Saunders Company**, Philadelphia: Guanabara Koogan; 2000.

Dahl J.E, Pallesen U. Tooth Bleaching: A Critical Review of The Biological Aspects. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14(4): 292-304.

De Bont R, van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 2004; 19(3): 169-85.

De Freitas PM, Turssi CP, Hara AT, Serra MC. Monitoring of demineralized dentin microhardness throughout and after bleaching. *Am J Dent* 2004; 17: 342-6.

Demple B, Linn B, Hallbrook J, Linn S. Escherichia coli with mutants are hypersensitive to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 1983; 153(2): 1079-1082.

Didenko VV. Methods in Molecular Biology, vol. 203, **Humana Press Inc**, Totowa NJ, 2006.

Diomede F, Caputi S, Merciaro I, Frisone S, D'Arcangelo C, Piattelli A, Trubiani O. Pro-inflammatory cytokine release and cell growth inhibition in primary human oral cells after exposure to endodontic sealer. **Int Endod J** 2014; 47(9): 864-872.

Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. **Mutat Res** 1992; 275(3-6): 331-42.

Duros L. M., Magne C. Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves. **Plant Physiol Biochem** 2009; 47(1): 7-41.

Durutürk L, Sarı S, Sengül A. Immunocompetent cell level as a diagnostic reference for pulpal pathosis of primary teeth. **Arch Oral Biol** 2013; 58(10): 1517–1522.

Duschner H, Gotz H, White DJ, Kozak KM, Zoladz JR. Effects of hydrogen peroxide bleaching strips on tooth surface colour, surface microhardness, surface and subsurface ultrastructure, and microchemical (Raman Spectroscopic) composition. **J Clin Dent** 2006; 17: 72-8.

Efeoglu N, Wood D, Efeoglu C. Microcomputerised tomography evaluation of 10% carbamide peroxide applied to enamel. **J Dent** 2005; 33(7): 561-7.

Eimar H, Siciliano R, Abdallah MN, Nader SA, Amin WM, Martinez PP, Celemin A, Cerruti M, Tamimi F. Hydrogen peroxide whitens teeth by oxidizing the organic structure. **J Dent** 2012; (40): 25-33.

Elbirt KE, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Bonkovsky HL. Mechanism of Sodium Arsenite-mediated Induction of Heme Oxygenase-1 in Hepatoma Cells Role Of Mitogen-Activated Protein Kinases. **J Biol Chem** 1998; 273(15): 8922-8931.

Erdemgil ŞN. Beyazlatıcı Ajanların Diş Sert Dokularında Oluşturdukları Kalsiyum Kayıplarının İncelenmesi. Doktora Tezi, **Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, İzmir, 1996.

Esposito P, Varvara G, Murmura G, Terlizzi A, Caputi S. Ability of healthy and inflamed human dental pulp to reduce hydrogen peroxide. **Eur J Oral Sci** 2003;111(5): 454-456.

Evans HM, Bishop KS. On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. **Science** 1922; 56(1458) :650-1.

Fasanaro TS. Bleaching teeth: history, chemicals, and methods used for common tooth discolorations. **J Esthet Dent** 1992; 4(3): 71-8.

Feinman RA, Madray G, Yarborough D. Chemical, optical, and physiologic mechanisms of bleaching products: a review. **Pract Periodontics Aesthet Dent** 1991; 3(2): 32-6.

Freire A, Archegas LR, de Souza EM, Vieira S. Effect of storage temperature on pH of in-office and at-home dental bleaching agents. **Acta Odontol Latinoam** 2009; 22: 27-31.

Fernandez MR, Carvalho RV, Ogliari FA, Beira FA, Etges A and Bueno M. Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: A comparison with bleaching agents commonly used in discoloured pulpless teeth. *Int Endod J* 2010; 43(2): 102-108.

Fidan A.F. Dna Hasar Tespitinde Tek Hücre Jel Elektroforezi. *Akü Fen Bilimleri Dergisi* 2009; 8(1): 53-64.

Ferreira VG, Nabeshima CK, Marques MM, Paris AF, Gioso MA, dos Reis RS, Machado ME. Tooth bleaching induces changes in the vascular permeability of rat incisor pulps. *Am J Dent* 2013; 26(5): 298-300.

Firat E, Ercan E, Gurgan S, Yalcin Cakir F, and Berker E. The Effect of Bleaching Systems on the Gingiva and the Levels of IL-1 β and IL-10 in Gingival Crevicular Fluid. *Oper Dent* 2011; 36(6): 572-580.

Fouad AF, Verma P. Healing after regenerative procedures with and without pulpal infection. *J Endod* 2014; 40(4): 58-64.

Ghalili KM, Khawaled K, Rozen D, Afsahi V. Clinical study of the safety and effectiveness of a novel over-the-counter bleaching tray system. *Clin Cosmet Investig Dent* 2014; (21)6: 15-9.

Godschalk RW, Ersson C, Riso P, Porrini M, Langie SA, van Schooten FJ, Azqueta A, Collins AR, Jones GD, Kwok RW, Phillips DH, Sozeri O, Allione A, Matullo G, Möller L, Forchhammer L, Loft S, Møller P. DNA-repair measurements by use of the modified comet assay: an inter-laboratory comparison within the European Comet Assay Validation Group (ECVAG). *Mutat Res* 2013; 757(1): 60-7.

Goldberg M, Lacerda-Pinheiro S, Jegat N, Six N, Septier D, Priam F, Bonnefoix M, Tompkins K, Chardin H, Denbesten P, Veis A, Poliard A. The impact of bioactive molecules to stimulate tooth repair and regeneration as part of restorative dentistry. *Dent Clin North Am* 2006; 50(2): 277-298

Goldberg M, Grootveld M, Lynch E. Undesirable and adverse effects of tooth-whitening products: a review. *Clin Oral Investig* 2010; 14(1): 1-10.

Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012; 3: 711-735.

Goldstein RE, Garber DA. Complete dental bleaching. *Quintessence Publishing Co, Inc*; Chicago, IL, 1995, S:26–32.

Gonçalves CE, Tokano-Ramos LV, Pascoto RC, Bersani-Amado CA. Intra-dermal irritation of dental bleaching agents in rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1998; 19(5): 422-4.

Green MH, Lowe JE, Delaney CA, Green IC. Comet assay to detect nitric oxide-dependent DNA damage in mammalian cells. *Methods Enzymol* 1996; 269: 243-66.

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(25): 13625-30.

Guney M, Erdemoglu E, Mungan T. Selenium-vitamin E combination and melatonin modulates diabetes-induced blood oxidative damage and fetal outcomes in pregnant rats. **Biol Trace Elem Res** 2011; 143(2): 1091-1102.

Gündoğdu G. Homosistein Toksisitesine Sülfid Molekülünün Olası Katkısı ve Oksidatif Stresin Rolünün Nöroblastoma Hücre Dizisinde İncelenmesi. Uzmanlık Tezi, **Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı**, Denizli 2012.

Hairul Nizam HR, Lim CT, Chng HK, Yap AUJ. Nanoindentation study of human premolars subjected to bleaching agent. **Journal of Biomechanics** 2005; 38: 2204-11.

Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol** 1990; 186: 1-85.

Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen-peroxide vital bleaching materials, in vitro. **J Dent Res** 1993; 72: 931-8.

Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. **Acta Odontol Scand** 2007; 65(1): 1-13.

Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA, Thesleff I. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. **J Cell Biol** 1999; 147(1): 105-20.

Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis** 2003; 18(1): 45-51.

Hartmann A, Schumacher M, Plappert-Helbig U, Lowe P, Suter W, Mueller L. Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. **Mutagenesis** 2004; 19(1): 51-9.

Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching: how safe is it? **Quint Int** 1991; 22: 515-523.

Haywood VB, Houck VM, Heymann HO. Nightguard vital bleaching: effects of various solutions on enamel surface texture and color. **Quint Int** 1991; 22: 775-82.

He LB, Shao MY, Tan K, Xu X, Li JY. The effects of light on bleaching and tooth sensitivity during in-office vital bleaching: a systematic review and meta-analysis. **J Dent** 2012; 40(8): 644-53.

Hegedüs C, Bistey T, Flóra-Nagy E, Keszthelyi G, Jenei A. An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. **J Dent** 1999; 27(7): 509-15.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J Nutr Biochem** 2002; 13(10): 572-584.

Hermeto L.C., Oliveira R.J., Matuo R., Jardim P.H.A., DeRossi R., Antonioli A.C.M.B., Deffune E., Evaristo T.C. and Santana Á.E. Evaluation of pH effects on genomic integrity in adipose-derived mesenchymal stem cells using the comet assay. **Genet Mol Res** 2015; 14 (1): 339-348.

Hirano T, Tamae K. Differentiation of Embryonic Stem Cells and Oxidative DNA Damage / DNA Repair Systems. *J Stem Cell Res Ther* 2012; S10: 5 sayfa.

Horst OV, Horst JA, Samudrala R, Dale BA. Caries induced cytokine network in the odontoblast layer of human teeth. *BMC Immunol* 2011; 12: 9.

Hosoya N, Honda K, Iino F, Arai T. Changes in enamel surface roughness and adhesion of *Streptococcus mutans* to enamel after vital bleaching. *J Dent* 2003; 31(8): 543-8.

Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 2009; 88(9): 792-806.

Iles KE, Dickinson DA, Wigleya AF, Weltya NE, Blankc V, Formand HJ. HNE increases HO-1 through activation of the ERK pathway in pulmonary epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 355-364.

Jeong GS, Lee DS, Li B, Lee HJ, Kim EC, Kim YC. Effects of sappanchalcone on the cytoprotection and anti-inflammation via heme oxygenase-1 in human pulp and periodontal ligament cells. *Eur J Pharmacol* 2010; 644: 230–237.

Joiner A. Review of the effects of peroxide on enamel and dentine properties. *J Dent* 2007; 35(12): 889-96.

Kalia YN, Guy RH, Modeling transdermal drug release. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 48: 159–172.

Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endod* 2004; 30(1): 45-50.

Kayaaltı Z, Yavuz İ, Söylemez E, Bacaksız A, Tutkun E, Sayal A, Söylemezoğlu T. Evaluation of DNA Damage Using 3 Comet Assay Parameters in Workers Occupationally Exposed to Lead. *Arch Environ Occup Health* 2015; 70, 120–125.

Kent C. Mutagens, Teratogens and Carcinogens, in “Basics of Toxicology”, 1998.

Khataee AR, Vatanpour V, Amani Ghadim AR. Decolorization of C.I. Acid Blue 9 solution by UV/Nano-TiO₂, Fenton, Fenton-like, electro-Fenton and electrocoagulation processes: a comparative study. *J Hazard Mater* 2009; 161(2-3): 1225-33.

Kim RH, Williams DW, Bae S, Lee RS, Oh JE, Mehrazarin S, Kim T, Shin KH, Park NH, Kang MK. Camphorquinone inhibits odontogenic differentiation of dental pulp cells and triggers release of inflammatory cytokines. *J Endod* 2013; 39(1): 57-61.

Kim YJ, Ahn YH, Lim Y, Kim JY, Kim J. and Kwon O. Daily Nutritional Dose Supplementation with Antioxidant Nutrients and Phytochemicals Improves DNA and LDL Stability: A Double-Blind, Randomized, and Placebo-Controlled Trial. *Nutrients* 2013; 5(12): 5218-32.

Kina JF, Huck C, Riehl H, Martinez TC, Sacono NT, Ribeiro AP, Costa CA. Response of human pulps after professionally applied vital tooth bleaching. *Int Endod J* 2010; 43(7): 572-80.

Kinter AL, Poli G, Fox L, Hardy E, Fauci AS. HIV replication in IL-2-stimulated peripheral blood mononuclear cells is driven in an autocrine/paracrine manner by endogenous cytokines. *J Immunol* 1995; 154(5): 2448-59.

Kirsten GA, Freire A, de Lima AA, Ignácio SA, Souza EM. Effect of reservoirs on gingival inflammation after home dental bleaching. *Quintessence Int* 2009; 40(3): 195-202.

Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002; 30(6): 620-50.

Klaric E., Par M., Profeta I., Kopjar N., Rozgaj R., Kasuba V., Zeljezić D. and Tarle Z. Genotoxic Effect Of Two Bleaching Agents On Oral Mucosa. *Cancer Genomics Proteomics* 2013; 10(5): 209-15.

Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res* 1996; 363(2): 89-96.

Ksouri R, Megdiche W, Debez A, Falleh H, Grignon C, Abdelly C. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiol Biochem* 2007; 45, 244-249.

Kuboyama A., Tanaka S., Kawai K., Kasai H., Morii H., Tamae K., Nakashima T. & Hirano T. Hydroxyguanine levels and repair capacity during mouse embryonic stem cell differentiation. *Free Radic Res* 2011; 45(5): 527–533.

Kumar V, Abbas A, Aster J. Robbins Temel Patoloji, *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, Eylül 2013, sayfa 48.

Kwon SR, Wertz PW, Li Y, Chan DCN. Penetration pattern of rhodamine dyes into enamel and dentin: confocal laser microscopy observation. *Int J Cosmet Sci* 2012; 34: 97-101.

Kwon SR, Wertz PW, Dawson DV, Cobb DS, Denehy G. The relationship of hydrogen peroxide exposure protocol to bleaching efficacy. *Oper Dent* 2013; 38(2): 177-85.

Kwon S.R., Wertz P.W. Review Of The Mechanism Of Tooth Whitening. *J Esthet Restor Dent* 2015; 27(5): 240–257.

Lee DH, Lim BS, Lee YK, Yang HC. Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol Toxicol* 2006; 22(1): 39-46.

Lee YH, Kang YM, Heo MJ, Kim GE, Bhattarai G, Lee NH, Yu MK, Yi HK. The survival role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces odontoblast differentiation against oxidative stress in human dental pulp cells. *J Endod* 2013; 39(2): 236–241.

Lee D.S., Li B., Kim K.S., Jeong G.S., Kim E.C, Kim Y.C. Butein protects human dental pulp cells from hydrogen peroxide-induced oxidative toxicity via Nrf2 pathway-dependent heme oxygenase-1 expressions. *Toxicol In Vitro* 2013; 27(2): 874-881

Lekutis C, Shiver JW, Liu MA, Letvin NL. HIV-1 env DNA vaccine administered to rhesus monkeys elicits MHC class II-restricted CD4+ T helper cells that secrete IFN-gamma and TNF-alpha. **J Immunol** 1997; 158(9): 4471-7.

Leonard RH, Teixeira EC, Garland GE, Ritter AV. Effect on enamel microhardness of two consumer-available bleaching solutions when compared with a dentist-prescribed, home-applied bleaching solution and a control. **J Esthet Restor Dent** 2005; 17: 343-50.

Lepinski AM, Hargreaves KM, Goodis HE, Bowles WR. Bradykinin levels in dental pulp by microdialysis. **J Endod** 2000; 26(12): 744-7.

Leprince JG, Zeitlin BD, Tolar M, Peters OA. Interactions between immune system and mesenchymal stem cells in dental pulp and periapical tissues. **Int Endod J** 2012; 45(8): 689-701.

Lequeux C., Lhoste A., Rovere M.R., Montastier C., O. Damour O. Model of in vitro Healing to Test the Influence of Dedifferentiated Crithmum maritimum Cells on Dermal Repair and Epidermal Regeneration. **Skin Pharmacol Physiol** 2011; 24(2): 75-80

Lewinstein I, Fuhrer N, Churaru N, Cardash H. Effect of different peroxide bleaching regimens and subsequent fluoridation on the hardness of human enamel and dentin. **J Prosthet Dent** 2004; 92: 337-42.

Li Y. Biological properties of peroxide-containing tooth whiteners. **Food Chem Toxicol** 1996; 34(9): 887-904.

Lima AF, Lessa FC, Mancini MN, Hebling J, Costa CA, Marchi GM. Transdental protective role of sodium ascorbate against the cytopathic effects of H₂O₂ released from bleaching agents. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2010; 109(4): 70-6.

Liu Y, Shepherd EG, Nelin LD. MAPK phosphatases--regulating the immune response. **Nat Rev Immunol** 2007; 7(3): 202-12.

Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. **Crit Rev Oral Biol Med** 2002; 13(2): 171-83.

Madhulika N., Rangdhol R.V., Sitra G., Ballaiah J., Jaikumar R.A. and Brooklyin S. A case-control study to detect the extent of DNA damage in oral lichen planus and oral lichenoid reactions using comet assay. **J Pharm Bio Allied Sci** 2015; 7(2): 451-456.

Majno G and Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis – An overview of cell death. **Am J Pathol** 1995; 146(1): 16-19.

Makpol S, Zainuddin A, Rahim NA, Yusof YA, Ngah WZ. Alphatocopherol modulates hydrogen peroxide-induced DNA damage and telomerase shortening of human skin fibroblasts derived from differently aged individuals. **Planta Med** 2010; 76(9): 869-875.

Markowitz K. Pretty painful: Why does tooth bleaching hurt? **Med Hypotheses** 2010; (74)5: 835-840.

Marson FC, Sensi LG, Reis R. New concept for the in-office bleaching technique. **Rev Dent Press Estet** 2008; 5: 55-66.

Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 2002; 192(1): 1-15.

Matos LF, Hernández LM, Ninoska A. Dental Bleaching Techniques; Hydrogen-carbamide Peroxides and Light Sources for Activation, an Update. Mini Review Article. *Open Dent J* 2014; 8: 264-268.

Matis BA. Degradation of gel in tray whitening. *Compend Contin Educ Dent Suppl* 2000; 28: 31-5.

Matsui S, Takahashi C, Tsujimoto Y, Matsushima K. Stimulatory effects of low-concentration reactive oxygen species on calcification ability of human dental pulp cells. *J Endod* 2009; 35(1): 67-72.

Mayo V, Sawatari Y, Huang CY, Garcia-Godoy F. Neural crest-derived dental stem cells--where we are and where we are going. *J Dent* 2014; 42(9): 1043-51.

McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Méo MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res* 1993; 288(1): 47-63.

McNamee JP, McLean JR, Ferrarotto CL, Bellier PV. Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutat Res* 2000; 466(1): 63-9.

McNaught AD, Wikinson A. Compendium of chemical terminology, IUPAC, *Wiley Blackwell* 2nd ed. (the "Gold Book", 2nd revised ed). Cambridge, UK, 1997.

Meireles SS, Heckmann SS, Leida FL, Santos IS, Bona AD, Demarco FF. Efficacy and Safety of %10 and %16 Carbamide Peroxide Tooth-whitening Gels: A Randomized Clinical Trial. *Oper Dent* 2008; 33(6): 606-612.

Min KS, Kwon YY, Lee HJ, Lee SK, Kang KH, Lee SK, Kim EC. Effects of proinflammatory cytokines on the expression of mineralization markers and heme oxygenase-1 in human pulp cells. *J Endod* 2006; 32(1): 39-43.

Min KS, Lee HJ, Kim SH, Lee SK, Kim HR, Pae HO, Chung HT, Shin HI, Lee SK, Kim EC. Hydrogen peroxide induces heme oxygenase-1 and dentin sialophosphoprotein mRNA in human pulp cells. *J Endod* 2008; 34(8): 983-989.

Mincarelli L., Vischetti C., Craft J. and Tiano L. DNA damage in different Eisenia andrei coelomocytes sub-populations after in vitro exposure to hydrogen peroxide. *Springerplus* 2016; 9(5): 302.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(10): 5807-12.

Moraes RR, Marimon JLM, Schneider LFJ, Correr-Sobrinho L, Camacho GB, Bueno M. Carbamide peroxide bleaching agents: effects on surface roughness of enamel, composite and porcelain. *Clin Oral Investig* 2006;10: 23–8.

Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Sippel C, Hoffmann KH. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* 2005; 24(2): 155-65.

Moscovitz H, Shofer F, Mignott H, Behrman A, Kilpatrick L. Plasma cytokine determinations in emergency department patients as a predictor of bacteremia and infectious disease severity. **Crit Care Med** 1994; 22(7): 1102-7.

Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. A silver staining method for single-cell gel assay. **J Histochem Cytochem** 2001; 49(9): 1183-6.

Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Crit Rev Oral Biol Med** 2004; 15(6): 348-81.

Nanci A. Ten Cate's oral histology, **Mosby Elsevier**, 7th ed. St. Louis, 2008.

Nucci C, Marchionni S, Piana G, Mazzoni A, Prati C. Morphological evaluation of enamel surface after application of two 'home' whitening products. **Oral Health Prev Dent** 2004; 2: 221-9.

Ohkura N, Shigetani Y, Yoshida N, Yoshida K, Okiji T. Prostaglandin Transporting Protein-mediated Prostaglandin E2 Transport in Lipopolysaccharide-inflamed Rat Dental Pulp. **JOE** 2014; 40(8).

Oltu U, Gürkan S. Effects of three concentrations of carbamide peroxide on the structure of enamel. **J Oral Rehabil** 2000; 27: 332-40.

Östling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun** 1984; 123(1): 291-8.

Palo RM, Bonetti-Filho I, Valera MC, Camargo CH, Camargo S, Moura-Netto C, Pameijer C. Quantification of peroxide ion passage in dentin, enamel, and cementum after internal bleaching with hydrogen peroxide. **Oper Dent** 2012; 37(6): 660-4.

Plotino G, Buono L, Grande NM, Pameijer CH, Somma F. Nonvital tooth bleaching: a review of the literature and clinical procedures. **J Endod** 2008; 34: 394-407.

Pugh G, Zaidel L, Lin N, Stranick M, Bayley D. High levels of hydrogen peroxide in overnight tooth-whitening formulas: effects on enamel and pulp. **J Esthet Restor Dent** 2005; 17: 40-7.

Reis A, Tay LY, Herrera DR, Kossatz S, Loguercio AD. Clinical effects of prolonged application time of an in-office bleaching gel. **Oper Dent** 2011; 36(6): 590-6.

Ribeiro DA, Marques ME, Salvadori DM. Assessment of genetic damage induced by dental bleaching agents on mouse lymphoma cells by single cell gel (comet) assay. **J Oral Rehabil** 2005; 32(10): 766-71.

Ribeiro D.A., Marques M.E.A., Salvadori D.M.F. Study of DNA damage induced by dental bleaching agents in vitro Estudo de danos no DNA induzidos por agentes clareadores dentais in vitro. **Braz Oral Res** 2006; 20(1): 47-51.

Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, de Souza Costa CA, Soares DG, Reis A, et al. Histopathological features of dental pulp tissue from bleached mandibular incisors. **J Mater Sci Eng B** 2014; 4(6): 178-185.

Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, Costa CA, Reis A, Loguercio AD. Response of human pulps to different in-office bleaching techniques: preliminary findings. **Braz Dent J** 2015; 26(3): 242-8.

Rodrigues JA, Oliveira GP, Amaral CM. Effect of thickener agents on dental enamel microhardness submitted to at-home bleaching. **Braz Oral Res** 2007; 21(2): 170-5.

Rojas E, Lopez MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl** 1999; 722(1-2): 225-54.

Rotstein I, Torek Y, Lewinstein I. Effect of bleaching time and temperature on the radicular penetration of hydrogen peroxide. **Endod Dent Traumatol** 1991; 7(5): 196-8.

Saito Y, Yoshida Y, Akazawa T, Takahashi K, Niki E. Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. **J Biol Chem** 2003; 278(41): 39428-39434.

Sakamoto K, Arakawa H, Mita S, Ishiko T, Ikei S, Egami H, Hisano S, Ogawa M. Elevation of circulating interleukin 6 after surgery: factors influencing the serum level. **Cytokine** 1994; 6(2): 181-6.

Sato C, Rodrigues FA, Garcia DM, Vidal CM, Pashley DH, Tjäderhane L, Carrilho MR, Nascimento FD, Tersariol IL. Tooth bleaching increases dentinal protease activity. **J Dent Res** 2013; 92(2): 187-192.

Sauro S, Pashley DH, Montanari M, Chersoni S, Carvalho RM, Toledano M, Osorio R, Tay FR, Prati C. Effect of simulated pulpal pressure on dentin permeability and adhesion of self-etch adhesives. **Dent Mater** 2007; 23(6): 705–713.

Schmölz L, Birringer M, Lorkowski S, Wallert M. Complexity of vitamin E metabolism. **World J Biol Chem** 2016; 7(1): 14-43.

Seale NS, McIntosh JE, Taylor AN. Pulpal reaction to bleaching of teeth in dogs. **J Dent Res** 1981; 60(5): 948-53.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet** 2004; 364(9429): 149-55.

Shamim AA, Schulze K, Merrill RD, Kabir A, Christian P, Shaikh S, Wu L, Ali H, Labrique AB, Mehra S, Klemm RD, Rashid M, Sungpuag P, Udomkesmalee E, West KP Jr. First-trimester plasma tocopherols are associated with risk of miscarriage in rural Bangladesh. **Am J Clin Nutr** 2015; 101(2): 294-301.

Silva FWGP, Ghosh A, Silva LAB, Kapila YL. TNF- α Promotes an Odontoblastic Phenotype in Dental Pulp Cells. **J Dent Res** 2009; 88(4): 339-344.

Smidt A, Weller D, Roman I, Gedalia I. Effect of bleaching agents on microhardness and surface morphology of tooth enamel. **Am J Dent** 1998; 11: 83-5.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res** 1988; 175(1): 184-91.

Simonson W1. Vitamin E for Alzheimer's disease? **Geriatr Nurs** 2014; 35(2): 147-8.

Slezak B, Santarpia P, Xu T, Monsul-Barnes V, Heu RT, Stranick M, et al. Safety profile of a new liquid whitening gel. **Compend Contin Educ Dent** 2002; 23: 4–11.

- Soares DG, Ribeiro AP, Sacono NT, Coldebella CR, Hebling J, Costa CA. Transenamel and transdentinal cytotoxicity of carbamide peroxide bleaching gels on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Int Endod J* 2011; 44(2): 116-25.
- Soares DG, Ribeiro AP, Silveira Vargas F, Hebling J, Souza Costa CA. Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel. *Clin Oral Investig* 2013; 17(8): 1901-1909.
- Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: Effects on pulp cell viability and whitening efficacy. *J Dent* 2014; 42(2): 185-198.
- Soares DG, Basso FG, Pontes EC, Garcia Lda F, Hebling J, de Souza Costa CA. Effective tooth-bleaching protocols capable of reducing H₂O₂ diffusion through enamel and dentine. *J Dent* 2014; 42(3): 351-8.
- Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Immediate and late analysis of dental pulp stem cells viability after indirect exposition to alternative in-office bleaching strategies. *Clin Oral Investig* 2015; 19(5): 1013-20.
- Soares DG, Basso FG, Scheffel DS, Hebling J, de Souza Costa CA. Responses of human dental pulp cells after application of a low-concentration bleaching gel to enamel. *Arch Oral Biol* 2015; 60(9): 1428-1436.
- Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Liu H, Gronthos S, Wang CY, Wang S, Shi S. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One* 2006; 20(1): 79.
- Sousa NG, Cardoso CR, Silva JS, Kuga MC, Tanomaru-Filho M, Faria G. Association of matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) with the expression of matrix metalloproteinases-1, -2 and -9 during periapical lesion development. *Arch Oral Biol* 2014; 59(9): 944-53.
- Spalding M, De Assis Taveira LA, De Assis GF. Scanning electron microscopy study of dental enamel surface exposed to 35% hydrogen peroxide: alone, with saliva, and with 10% carbamide peroxide. *J Esthet Restor Dent* 2003; 15: 154-65.
- Spoto G, Fioroni M, Rubini C, Tripodi D, Stilio MD, Piattelli A. Alkaline Phosphatase Activity in Normal and Inflamed Dental Pulp. *J Esthet Restor Dent* 2001;27(3).
- Squier TC. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp Gerontol* 2001; 36(9): 1539-1550.
- Spivak G. New developments in comet-FISH. *Mutagenesis* 2015; 30(1): 5-9.
- Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9(4): 498-521.
- Sulieman M, Addy M, Macdonald E, Rees JS. A safety study in vitro for the effects of an in-office bleaching system on the integrity of enamel and dentine. *J Dent* 2004; 32: 581-90.
- Tahan G, Aytac E, Aytakin H, Gunduz F, Dogusoy G, Aydin S. Vitamin E has dual effect of anti-inflammatory and antioxidant activities in acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Can J Surg* 2011; 54(5): 333-338.

Teixeira ECN, Ritter AV, Thompson JY, Leonard RH, Swift EJ. Effect of tray-based and trayless tooth whitening systems on microhardness of enamel surface and subsurface. **Am J Dent** 2004; 17: 433–6.

Torres CR, Wiegand A, Sener B, Attin T. Influence of chemical activation of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on its penetration and efficacy--in vitro study. **J Dent** 2010; 38(10): 838-46.

Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. **Nature** 1987; 330(6149): 662-4.

Trindade FZ, Ribeiro AP, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FC, Hebling J, Costa CA. Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H₂O₂ bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. **Int Endod J** 2009; 42(6): 516-24.

Turkun M, Sevgican F, Pehlivan Y, Aktener BO. Effects of 10% carbamide peroxide on the enamel surface morphology: a scanning electron microscopy study. **J Esthet Restor Dent** 2002; 14: 238–44.

Ubal dini AL, Baesso ML, Medina Neto A, Sato F, Bento AC, Pascotto RC. Hydrogen peroxide diffusion dynamics in dental tissues. **J Dent Res** 2013; 92(7): 661-5.

Unlu N, Cobankara FK, Altinoz C, Ozer F. Effect of home bleaching agents on the microhardness of human enamel and dentin. **J Oral Rehabil** 2004; 31: 57–61.

Vargas F.S., Soares D.G., Basso F.G., Hebling J., Carlos Alberto de Souza Costa C.A.S. Dose-Response and Time-Course of α -Tocopherol Mediating the Cytoprotection Of Dental Pulp Cells Against Hydrogen Peroxide. **Braz Dent J** 2014; 25(5): 367-371.

Vargas F.S., Soares D.G., Ribeiro A.P.D., Hebling J. and Costa C.A.S. Protective Effect of Alpha-Tocopherol Isomer from Vitamin E against the H₂O₂ Induced Toxicity on Dental Pulp Cells. **Biomed Res Int** 2014; 5 sayfa.

Vargas Fda S, Soares DG, Basso FG, Hebling J, Costa CA. Dose-Response and Time-Course of α -Tocopherol Mediating the Cytoprotection Of Dental Pulp Cells Against Hydrogen Peroxide. **Braz Dent J** 2014; 25(5): 367-371.

Veerayutthwilai O, Byers MR, Pham TT, Darveau RP, Dale BA. Differential regulation of immune responses by odontoblasts. **Oral Microbiol Immunol** 2007; 22(1): 5-13.

Vidhya S, Srinivasulu S, Sujatha M, Mahalaxmi S. Effect of grape seed extract on the bond strength of bleached enamel. **Oper Dent** 2011; 36(4): 433-8.

Vieira MHC, Oliveira RJ, Eça LPM, Pereira ISO, Hermeto LC, Matuo R, Fernandes WS, Silva RA, Antonioli ACMB. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells to treat Achilles tendon injuries. **Genet Mol Res** 2014; 13 (4): 10434-10449.

Vinoth K.J., Heng B.C., Poonepalli A., Banerjee B., Balakrishnan L., Lu K., Hande M.P. And Cao T. Human Embryonic Stem Cells May Display Higher Resistance To Genotoxic Stress As Compared To Primary Explanted Somatic Cells. **Stem Cells Dev** 2008; 17(3): 599-607.

Vinoth K.J., George S., Heng B.C., Kishen A. and Cao T. Comparison of the Response of Human Embryonic Stem Cells and Their Differentiated Progenies to Oxidative Stress. **Photomed Laser Surg** 2009; 27(4): 669-674.

Vinoth K.J., Manikandan J., Sethu S., Balakrishnan L., Heng A., Lu K., Anuradha Poonepalli A., Manoor Prakash Hande M.P., Tong Cao T. Differential resistance of human embryonic stem cells and somatic cell types to hydrogen peroxide-induced genotoxicity may be dependent on innate basal intracellular ROS levels. **Folia Histochem Cytobiol** 2015; 53(2): 169-174.

Wang Y, Yao X. Morphological/chemical imaging of demineralized dentin layer in its natural, wet state. **Dent Mater** 2010; 26(5): 433-42.

Weiger R, Kuhn A, Löst C. In vitro comparison of various types of sodium perborate used for intracoronary bleaching of discolored teeth. **J Endod** 1994; 20(7): 338-41.

Weitzman SA, Weitberg AB, Stossel TP, Schwartz J, Sklar G. Effects of hydrogen peroxide on oral carcinogenesis in hamsters. **J Periodontol** 1986; 57(11): 685-688.

White DJ, Kozak KM, Zoladz JR, Duschner HJ, Gotz H. Effects of tooth whitening gels on enamel and dentin ultrastructure—a confocal laser scanning microscopy pilot study. **Compend Contin Educ Dent Suppl** 2000; 21: 29–S34.

White DJ, Kozak KM, Zoladz JR, Duschner HJ, Gotz H. Peroxide interactions with hard tissues: effects on surface hardness and surface/subsurface ultrastructural properties. **Compend Contin Educ Dent Suppl** 2002; 23: 42–8.

Wiegand A, Drebenstedt S, Roos M, Magalhães AC, Attin T. 12-month color stability of enamel, dentine, and enamel-dentine samples after bleaching. **Clin Oral Investig** 2008; 12(4): 303-10.

Wintergerst ES, Maggini S, Hornig DH. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. **Ann Nutr Metab** 2007; 51(4): 301-323.

Worschech CC, Rodrigues JA, Martins LRM, Ambrosano GMB. In vitro evaluation of human dental enamel surface roughness bleached with 35% carbamide peroxide and submitted to abrasive dentifrice brushing. **Pesqui Odontol Bras** 2003; 17: 342–8.

Wu TT, Li LF, Du R, Jiang L, Zhu YQ. Hydrogen peroxide induces apoptosis in human dental pulp cells via caspase-9 dependent pathway. **J Endod** 2013; 39(9): 1151–1155.

Yazid FB, Gnanasegaran N, Kunasekaran W, Govindasamy V, Musa S. Comparison of immunomodulatory properties of dental pulp stem cells derived from healthy and inflamed teeth. **Clin Oral Investig** 2014; 18(9): 2103–2112.

Yedjou C.G., Tchounwou H.M. and Tchounwou P.B. DNA Damage, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis Induction Caused by Lead in Human Leukemia Cells. **Int J Environ Res Public Health** 2015; 13(1).

Yeh S-T, Su Y, Lu Y-C, Lee S-Y. Surface changes and acid dissolution of enamel after carbamide peroxide bleach treatment. **Oper Dent** 2005; 30: 507–15.

Yilmaz N, Yilmaz M, Altuntas I. Diozinon-induced brain toxicity and protection by vitamins E plus C. **Toxicol Ind Health** 2012; 28(1): 51-57.

Yoshino F, Yoshida A, Okada E, Okada Y, Maehata Y, Miyamoto C, Kishimoto S, Otsuka T, Nishimura T, Lee MC. Dental resin curing blue light induced oxidative stress with reactive oxygen species production. *J Photochem Photobiol B* 2012; 114: 73-8. Epub 2012 May 24.

Yu MK, Lee JC, Kim JH, Lee YH, Jeon JG, Jhee EC, Yi HK. Anti-inflammatory effect of peroxisome proliferator activated receptor gamma on human dental pulp cells. *J Endod* 2009; 35(4): 524-8.

Yurdakul T, Kulaksizoglu H, Pişkin MM, Avunduk MC, Ertemli E, Gokçe G, Barışkaner H, Byükbaş S, Kocabas V. Combination antioxidant effect of α -tocopherol and erdosteine in ischemia-reperfusion injury in rat model. *Int Urol Nephrol* 2010; 42(3): 647-655.

Zalkind M, Arwaz JR, Goldman A, Rotstein I. Surface morphology changes in human enamel, dentin and cementum following bleaching, a scanning electron microscopy study. *Endod Dent Traumatol* 1996; 12: 82–8.

Zhu T, Lim BS, Park HC, Son KM, Yang HC. Effects of the iron-chelating agent deferoxamine on triethylene glycol dimethacrylate, 2-hydroxyethyl methacrylate, hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012; 100(1): 197-205.

Zouain-Ferreira SL, Zouain-Ferreira TR, da Silva CR, Cervantes Dias KR, Caldeira-de-Araujo A, Bernardo-Filho M. Radiation induced-like effects of four home bleaching agents used for tooth whitening: effects on bacterial cultures with different capabilities of repairing deoxyribonucleic acid (DNA) damage. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2002; 48(5): 521-524.

WEB_1. friends of hu-friedy Academy internet sitesi. <http://www.friendsofhu-friedy.com/education/StemCells.asp>, Stem Cells: Emerging Medical and Dental Therapies and the Dental Professional. Full Speaker Notes. Gregory Chotkowski, DMD, President - StemSave, Inc. (son güncelleme tarihi: 12.10.2010, alındığı tarih: 19.09.2014)

WEB_2. National Institutes of Health, Office of Dietary Supplements. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Antioksidants.MedlinePlusHealthInformation.VitaminE>. (Alındığı tarih 21.03.2016)

WEB_3. Rel Assay Diagnostics® internet sitesi. Total Oxidant Status (TOS) ve Total Antioxidant Status (TAS). <http://www.rel assay.com/?sf=3&a-35-135=21>. (son güncelleme tarihi:10.04.2012, Alındığı tarih 26.03.2016)

WEB_4. XTT Cell Proliferation Assay Kit. Instruction Manual. <https://www.atcc.org/~media/56374CEEC36C47159D2040410828B969.ashx>. (Alındığı tarih 03.07.2014)

WEB_5. [A dummy's guide to image analysis used in the comet assay](http://botanika.biologija.org/exp/comet/Comet-principles.pdf). botanika.biologija.org/exp/comet/Comet-principles.pdf. (Alındığı tarih 22.10.2015)

8.ÖZGEÇMİŞ

19.12.1979 tarihinde Denizli'de dünyaya gelen Mukaddes MERGEN DALYANOĞLU ilköğrenimini Hacı Halil Bektaş İlkokulu'nda, orta öğrenimini Pamukkale Okulu'nda, lise öğrenimini Anafartalar Süper Lisesi'nde tamamlamıştır. 2002 yılında Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesini bitirmiştir. 2002-2015 yılları arasında özel sektörde diş hekimliği yapmıştır. Aynı zamanda Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine 2011 yılı Eylül ayında başlamıştır. Evli ve 2 kız çocuk annesi olan Mukaddes MERGEN DALYANOĞLU, 2015 yılı Şubat ayından beri Pamukkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nde öğretim görevlisi olarak çalışmaktadır.